

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA CRISTINA SCHMIDT

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA INDUZIDA
POR ESTRESSE-1 (STI-1) DE *Trypanosoma cruzi***

CURITIBA

2010

JULIANA CRISTINA SCHMIDT

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA INDUZIDA
POR ESTRESSE-1 (STI-1) DE *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná, como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências, área Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Marco Aurélio Krieger

CURITIBA

2010

Este trabalho foi desenvolvido no Instituto Carlos Chagas - FIOCRUZ, Curitiba/PR.

*“Pode um homem tornar-se culto pela
cultura dos outros, mas só se torna sábio
pelas próprias experiências”*

Mansour Challita

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marco Aurélio Krieger por ter me acolhido em sua equipe e pela sua confiança em meu trabalho. Agradeço todo o apoio recebido durante a orientação desta tese em todos os sentidos, e em especial sua compreensão com minhas viagens periódicas devido aos meus compromissos docentes em Chapecó durante o período do doutorado.

Ao Dr. Samuel Goldenberg pela oportunidade de desenvolver este trabalho no Instituto Carlos Chagas (ICC-Fiocruz/PR), reconhecido por sua infra-estrutura e seus profissionais excepcionais.

Ao Dr. Stenio Fragoso pelo apoio técnico e científico em vários experimentos desenvolvidos no Instituto, sempre disposto a auxiliar no que fosse possível com paciência e atenção.

Ao Dr. Maurílio Soares por todo o apoio nos experimentos de microscopia e também por sua paciência nas exaustivas análises de imagem realizadas durante este trabalho.

Aos pesquisadores do Laboratório de Genômica, Dr. Christian Probst agradeço todo o auxílio nas análises de bioinformática; Dra. Daniela Pavoni agradeço o apoio principalmente no processo de finalização desta tese, com sugestões e críticas sempre construtivas; e Dr. Fabrício Marchini agradeço o apoio nos experimentos com animais e nos ensaios de análise proteômica, com discussões sempre pertinentes sobre a metodologia.

Aos outros pesquisadores e colaboradores do Instituto, em especial à Dra.

Andréa Ávila, ao Dr. Augusto Ramos, Ao Dr. Bruno Dallagiovana e ao Dr. Alejandro Correa pelo apoio e sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas do ICC que contribuíram de forma direta ou indireta com o desenvolvimento deste trabalho, em especial à Marcinha, ao Giovani, e à Carla por todo o auxílio nos experimentos com os animais, ao Dr. Lauro Manhães pela colaboração nos ensaios de citometria de fluxo, e a Dra. Paola Celedón pelo apoio nos experimentos de imunoprecipitação e proteômica.

Ao Nilson, à Vanessa, à Tânia, ao Paulo e à Andréia Dallabona por todo apoio técnico recebido durante o período de doutorado, sempre dispostos a auxiliar o que fosse necessário.

À Maria Cristina, à Edilaine e ao Luís pelo apoio logístico durante todo o trabalho, sempre atenciosos e prestativos.

Aos colegas do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), em especial à Dra. Viviane Monteiro Góes pelos primeiros ensinamentos práticos em genômica e proteômica e por ter confiado a mim o prosseguimento de seus estudos sobre resposta ao estresse em *T. cruzi*.

Aos Colegas da Unochapecó, especialmente aos coordenadores dos cursos de Farmácia e Medicina, Ilo Villa Dias e Marcelo Moreno, pela compreensão com minhas viagens periódicas à Curitiba e pelo apoio na organização de minhas atividades docentes de modo a permitir conciliar com as atividades do doutorado.

A toda a família em Chapecó e em Curitiba, que sempre me ofereceu apoio nessa jornada, em especial ao Sandro por ter me incentivado e apoiado, mesmo à distância, principalmente nos momentos mais difíceis.

A Deus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O CICLO DE VIDA DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.2 O GENOMA DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.3 A EXPRESSÃO GÊNICA E SUA REGULAÇÃO EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
1.4 ESTUDO DO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO DE <i>T. cruzi</i> DURANTE A METACICLOGÊNESE <i>in vitro</i>	11
1.5 DIFERENCIAÇÃO CELULAR E CONDIÇÕES DE ESTRESSE.....	14
1.6 RESPOSTA CELULAR AO ESTRESSE POR PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSPs).....	16
1.7 A PROTEÍNA INDUZIDA POR ESTRESSE (STI-1).....	22
1.7.1 Localização celular da proteína STI-1.....	25
1.7.2 Interação da STI-1 com HSP70 e HSP90.....	26
1.7.3 Interação da STI-1 com a proteína prion celular e a sobrevivência e diferenciação celular.....	32
2 OBJETIVOS.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 REAGENTES E MATERIAIS.....	36
3.2 MEIOS DE CULTURA.....	37
3.3 SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	38
3.4 MICRO-ORGANISMOS E PLASMÍDEOS.....	40
3.5 CULTIVO DE <i>T. brucei</i>	42
3.6 CULTIVO DE <i>T. cruzi</i>	42
3.6.1 Epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (Epi 3 dias).....	42
3.6.2 Epimastigotas submetidos aos diferentes tipos de estresses.....	43
3.6.2.1 Epimastigotas submetidos ao estresse nutricional.....	43

3.6.2.2 Epimastigotas submetidos ao estresse de pH.....	43
3.6.2.3 Epimastigotas submetidos ao estresse de temperatura.....	43
3.6.3 Epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (Epi 5 dias).....	44
3.6.4 Epimastigotas em diferenciação, durante o processo de metaciclogênese <i>in vitro</i> (aderidos ao substrato).....	44
3.6.5 Tripomastigotas metacíclicos (Meta).....	45
3.7 MÉTODOS GERAIS PARA DNA E RNA.....	45
3.7.1 Isolamento de plasmídeos.....	45
3.7.2 Isolamento de DNA genômico de <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i>	45
3.7.3 Isolamento de RNAm polissomal de <i>T. cruzi</i>	46
3.7.4 Determinação da quantidade e qualidade dos ácidos nucléicos.....	47
3.7.5 Eletroforese de DNA.....	47
3.7.6 Amplificação de DNA por PCR.....	48
3.7.7 Clonagem do gene <i>sti-1</i> de <i>T. cruzi</i>	49
3.7.8 Transformação bacteriana e seleção de clones recombinantes.....	51
3.7.9 Sequenciamento de DNA.....	51
3.7.10 Análises de Bioinformática.....	51
3.8 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL.....	52
3.8.1 Obtenção de DNA complementar a partir do RNAm polissomal.....	52
3.8.2 Amplificação dos genes selecionados.....	53
3.8.3 Análise dos resultados da qPCR.....	54
3.9 MÉTODOS GERAIS PARA PROTEÍNAS.....	55
3.9.1 Preparação de extratos protéicos de <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i>	55
3.9.2 Eletroforese em gel de poliácridamida sob condição desnaturante.....	55
3.9.3 Produção da proteína STI-1 recombinante de <i>T. cruzi</i> em sistema bacteriano.....	56
3.9.4 Purificação da proteína STI-1 recombinante de <i>T. cruzi</i>	57
3.9.5 Produção de antissoro policlonal.....	58
3.9.6 Análise de expressão de proteínas por <i>Western blotting</i>	59
3.10 ENSAIOS DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA.....	61
3.10.1 Co-Imunoprecipitação das proteínas TcSTI-1 e TcHSP70.....	61
3.10.2 Imunoprecipitação de complexos protéicos associados à proteína TcSTI-1 para identificação por espectrometria de massa	62
3.11 INATIVAÇÃO DO GENE <i>Tcsti-1</i> ATRAVÉS DE NOCAUTE GÊNICO EM <i>T. cruzi</i>	63

3.11.1 Amplificação das regiões intergênicas a montante e a jusante do gene <i>sti-1</i> de <i>T. cruzi</i> para construção dos cassetes para nocaute.....	64
3.11.2 Clonagem das regiões intergênicas do gene <i>sti-1</i> de <i>T. cruzi</i> para construção dos cassetes para nocaute.....	65
3.11.3 Amplificação e purificação dos cassetes para nocaute usados na transfecção dos parasitas.....	66
3.11.4 Transfecção com os cassetes para nocaute e seleção dos parasitas resistentes.....	68
3.11.5 Análise do DNA total dos parasitas transfectados com os cassetes para nocaute.....	69
3.11.6 Curva de crescimento e diferenciação de <i>T. cruzi</i>	70
3.12 SILENCIAMENTO DO GENE <i>Tbsti-1</i> POR INTERFERÊNCIA DE RNA EM <i>T. brucei</i>	72
3.12.1 Amplificação de porção 3' do gene <i>sti-1</i> de <i>T. brucei</i>	72
3.12.2 Clonagem do segmento 3' do gene <i>Tbsti-1</i>	73
3.12.3 Transfecção e seleção dos parasitas.....	73
3.12.4 Indução de interferência de RNA em <i>T. brucei</i>	74
3.13 ENSAIOS CITOLÓGICOS.....	74
3.13.1 Ensaios de imunolocalização por fluorescência indireta.....	74
3.13.2 Análise da viabilidade, diferenciação e ciclo celular de <i>T. cruzi</i> por citometria de fluxo.....	75
3.13.3 Coloração de parasitas para microscopia de luz.....	76
4 RESULTADOS.....	78
4.1 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE STI-1 DE <i>T. cruzi</i> E OBTENÇÃO DE ANTÍSSORO ESPECÍFICO.....	80
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcSTI-1 EM PARASITAS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE.....	82
4.2.1 Perfil de expressão do gene <i>sti-1</i> de <i>T. cruzi</i> sob diferentes condições de estresse.....	83
4.2.2 Localização celular da proteína TcSTI-1 em parasitas submetidos ou não a condições de estresse.....	84
4.2.3 Interação da proteína TcSTI-1 com a proteína TcHSP70.....	87
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcSTI-1 EM PARASITAS DURANTE A METACICLOGÊNESE.....	88
4.3.1 Perfil de expressão da STI-1 de <i>T. cruzi</i> em diferentes formas do parasita	88
4.3.2 Localização celular da proteína TcSTI-1 em diferentes formas do parasita	90
4.3.3 Interação da proteína TcSTI-1 com outras proteínas do parasita.....	96

4.4 CARACTERIZAÇÃO DE PARASITAS COM BLOQUEIO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>sti-1</i>	98
4.4.1 Capacidade de proliferação de <i>T. brucei</i> com gene <i>sti-1</i> silenciado.....	98
4.4.2 Capacidade de proliferação de <i>T. cruzi</i> com gene <i>sti-1</i> parcialmente inativado.....	100
4.4.3 Capacidade de diferenciação de <i>T. cruzi</i> com gene <i>sti-1</i> parcialmente inativado.....	106
5 DISCUSSÃO.....	114
6 CONCLUSÕES.....	126
7 PERSPECTIVAS.....	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129
APÊNDICES.....	144

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – CICLO DE VIDA DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
FIGURA 1.2 – DOMÍNIOS PRESENTES NAS PROTEÍNAS STI-1/Hop DE DIFERENTES ORGANISMOS.....	27
FIGURA 1.3 – MODELO GERAL DA MONTAGEM DO HETEROCOMPLEXO DE CHAPERONAS E CO-CHAPERONAS.....	29
FIGURA 1.4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS INTERAÇÕES FUNCIONAIS DA STI-1 EM ASTRÓCITOS E VIAS DE SINALIZAÇÃO.....	33
FIGURA 3.1 – ESQUEMA DE CLONAGEM POR RECOMBINAÇÃO USANDO SISTEMA GATEWAY.....	50
FIGURA 3.2 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DA AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DAS REGIÕES INTERGÊNICAS DE <i>Tcsti-1</i>	66
FIGURA 4.1 – COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE PROTEÍNAS STI-1 DE VÁRIOS ORGANISMOS.....	79
FIGURA 4.2 – EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE TcSTI-1 EM <i>E. coli</i>	80
FIGURA 4.3 – PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TcSTI-1 RECOMBINANTE.....	81
FIGURA 4.4 – AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS ANTISSOROS CONTRA TcSTI-1.....	82
FIGURA 4.5 – PERFIL DE EXPRESSÃO DE <i>Tcsti-1</i> EM PARASITAS SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE.....	84
FIGURA 4.6 – IMUNOLOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcSTI-1 E TcHSP70 EM FORMAS EPIMASTIGOTAS NÃO SUBMETIDAS A CONDIÇÕES DE ESTRESSE.....	85
FIGURA 4.7 – IMUNOLOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcSTI-1 E TcHSP70 EM FORMAS EPIMASTIGOTAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE NUTRICIONAL.....	86
FIGURA 4.8 – CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcSTI-1 E TcHSP70.....	87
FIGURA 4.9 – PERFIL DOS NÍVEIS DA PROTEÍNA TcSTI-1 EM DIFERENTES FORMAS DO PARASITA.....	89
FIGURA 4.10 – IMUNOLOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcSTI-1 EM DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DO PARASITA.....	91
FIGURA 4.11 – IMUNOLOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcSTI-1 E TcHSP70 EM DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DO PARASITA.....	93
FIGURA 4.12 – IMUNOLOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcSTI-1 E TcDhh1 EM DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DO PARASITA.....	95

FIGURA 4.13 – IMUNOPRECIPITAÇÃO NAS CONDIÇÕES DE ENSAIO DEFINIDAS.....	97
FIGURA 4.14 – CURVA DE CRESCIMENTO E MORFOLOGIA DE <i>T. brucei</i> COM GENE <i>Tbsti-1</i> SILENCIADO E NÃO SILENCIADO	99
FIGURA 4.15 – ANÁLISE DO DNA GENÔMICO DE <i>T. cruzi</i> MUTANTE EM COMPARAÇÃO AO SELVAGEM (WT).....	102
FIGURA 4.16 – PERFIL DOS NÍVEIS DA PROTEÍNA TcSTI-1 NO PARASITA SELVAGEM (WT) E MUTANTE (Mut).....	103
FIGURA 4.17 – CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>T. cruzi</i> SELVAGEM E MUTANTE.....	104
FIGURA 4.18 – ANÁLISE MORFOLÓGICA DE FORMAS EPIMASTIGOTAS SELVAGENS E MUTANTES DURANTE O CRESCIMENTO <i>in vitro</i> DE <i>T. cruzi</i>	105
FIGURA 4.19 – PERFIL DE DIFERENCIAÇÃO DE PARASITAS SELVAGEM (WT) E MUTANTE DURANTE A METACICLOGÊNESE <i>in vitro</i>	108
FIGURA 4.20 – PERFIL DE DIFERENCIAÇÃO DE <i>T. cruzi</i> SELVAGEM E MUTANTE DURANTE A METACICLOGÊNESE <i>in vitro</i> AVALIADO POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	109
FIGURA 4.21 – DISTRIBUIÇÃO DO DNA NUCLEAR DE ACORDO COM A FASE DO CICLO CÉLULAR DURANTE O PROCESSO DE METACICLOGÊNESE <i>in vitro</i> DE <i>T. cruzi</i> SELVAGEM E MUTANTE.....	111
FIGURA 4.22 – ANÁLISE MORFOLÓGICA DE PARASITAS SELVAGEM E MUTANTE DURANTE O PROCESSO DE METACICLOGÊNESE <i>in vitro</i>	113

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 – PLASMÍDEOS.....	41
TABELA 3.2 – LISTA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES USADOS NA PCR QUANTITATIVA.....	53
TABELA 3.3 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA NOCAUTE DE <i>Tcsti-1</i>	65
TABELA 3.4 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA ANÁLISE DO DNA TOTAL DOS TRANSFECTANTES.....	69
TABELA 4.1 – DISTRIBUIÇÃO DO CONTEÚDO NUCLEAR DE ACORDO COM O CICLO CELULAR DE <i>T. cruzi</i> SELVAGEM E MUTANTE DURANTE O CRESCIMENTO <i>in vitro</i>	106
TABELA 4.2 – TAXA DE DIFERENCIAÇÃO DE <i>T. cruzi</i> SELVAGEM E MUTANTE DURANTE A METACICLOGÊNESE <i>in vitro</i> AVALIADA POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	109
TABELA 4.3 – TAXA DE MORTALIDADE DE <i>T. cruzi</i> SELVAGEM E MUTANTE DURANTE A METACICLOGÊNESE <i>in vitro</i>	110

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: adenosina trifosfato

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

BSA: *bovine serum albumine*, albumina bovina sérica

cDNA: DNA complementar

DEPC: dietil pirocarbonato

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNase: desoxirribonuclease

dNTP: desoxiribonucleosídeo trifosfato

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

g: aceleração da gravidade

HSP: *heat shock protein*, proteína de choque térmico

IPTG: isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosídeo

kb: 1000 nucleotídeos em RNA ou 1000 pares nucleotídeos em DNA

kDa: quilo Dalton

kDNA: DNA do cinetoplasto

LIT: *liver infusion tryptose*

LB: Luria-Bertani

M: molar ou mol/L

Mb: 1000 kb

NBT: nitro-blue tetrazolio

Ni-NTA: *nickel-nitrilotriacetic acid*

pb: pares de base

PBS: tampão fosfato

PCR: reação em cadeia pela polimerase

RNA: ácido ribonucléico

RNase: ribonuclease

RNA_m: RNA mensageiro

SDS: sódio dodecil sulfato

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

TAU: *triatomine artificial urine*

TIGR: *The Institute of Genome Research*

Tris: hidroximetil aminometano

UTR: *untranslated region*; região não traduzida

RESUMO

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é um parasita que durante seu ciclo de vida está exposto a diversos estresses ambientais nos hospedeiros invertebrado e vertebrado. Apesar das condições de estresse estarem envolvidas em seus processos de diferenciação, existe pouca informação disponível sobre as proteínas envolvidas na resposta ao estresse. Este trabalho relata a primeira caracterização da proteína induzida pelo estresse de *T. cruzi* (TcSTI-1), uma co-chaperone cuja expressão é induzida por choque térmico e outras condições de estresse e que medeia a formação de um complexo entre Hsp70 e Hsp90 em diversos organismos. A análise da sequência da TcSTI-1 mostrou que a proteína apresenta similaridade significativa com a sequência de aminoácidos de proteínas STI-1 de outros organismos, no entanto, seu perfil de expressão em resposta a várias condições de estresse (choque térmico, o pH ácido ou escassez de nutrientes) é diferente. Não houve alteração significativa nos níveis de RNAm polissomal, nem nos níveis protéicos de epimastigotas em crescimento exponencial cultivados em quaisquer condições de estresse estudadas. Embora em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos sua expressão seja constitutiva, um aumento significativo nos níveis da proteína foi observado em epimastigotas em fase tardia de crescimento submetidas ao estresse nutricional. Ensaio de co-imunoprecipitação mostraram associação entre TcSTI-1 e TcHSP70 em epimastigotas de *T. cruzi*. Análises por imunofluorescência indireta mostraram que TcSTI-1 está localizada de modo difuso e constituindo alguns grânulos no citoplasma, que aparecem em maior número em epimastigotas em fase tardia de crescimento e em epimastigotas em fase tardia de crescimento submetidos ao estresse nutricional. Foi observado que parte do sinal de ambas as proteínas TcSTI e TcHSP70-1 colocaliza ao redor do núcleo. O silenciamento do gene *sti-1* de *T. brucei* não afetou o crescimento celular. Da mesma forma, o crescimento de parasitas mutantes de *T. cruzi* com o gene *sti-1* parcialmente inativado não foi afetado, porém a diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese) foi comprometida. Uma taxa e número mais baixo de tripomastigotas metacíclicos foi obtido a partir de parasitas mutantes em relação ao tipo selvagem. Estes dados indicam que TcSTI-1 se associa com HSP70, mas, diferente de outros organismos, TcSTI-1 nas células em crescimento exponencial não foi induzida pelas condições de estresse deste estudo. Além disso, níveis reduzidos de TcSTI-1 diminuem a taxa de metaciclogênese *in vitro*, indicando que esta proteína pode participar no desencadeamento do processo de diferenciação de *T. cruzi*.

Palavras-chave: STI-1, estresse, metaciclogênese, *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

The protozoan *Trypanosoma cruzi* is a parasite that during its life cycle is exposed to several environmental stresses in the invertebrate and vertebrate hosts. Although stress conditions are involved in its differentiation processes, little information is available about stress response proteins involved in these responses. This work reports the first characterization of the stress induced protein-1 from *T. cruzi* (TcSTI-1), a co-chaperone whose expression is induced by heat shock and other stress conditions and that mediates the formation of a complex between Hsp70 and Hsp90 in several organisms. Analysis of protein sequence showed that TcSTI-1 exhibits significant amino acid similarity to STI-1 proteins of other organisms, however, its expression profile in response to various stress conditions (heat shock, acid pH or nutrient starvation) is quite different. Neither polysomal mRNA nor protein levels changed significantly in exponentially growing epimastigotes cultured in any stress conditions studied. Albeit in epimastigotes and metacyclic trypomastigotes its expression be constitutive, high protein levels were observed in late grow phase epimastigotes subjected to nutritional stress. Co-immunoprecipitation assays showed association of TcSTI-1 and TcHSP70 in *T. cruzi* epimastigotes. Analysis by indirect immunofluorescence demonstrated that TcSTI-1 is located throughout the cell cytoplasm with some cytoplasm granules, that appear in greater numbers in late growing epimastigotes and late growing epimastigotes subject to nutritional stress. It was observed that part of signal from both TcSTI-1 and TcHSP70 co-localizes around the nucleus. Gene silencing of *sti-1* from *T. brucei* not affected cell growing. Similarly, the growth of *T. cruzi* mutant parasites with the gene *sti-1* partly inactivated was not affected, however the differentiation of epimastigotes into metacyclic trypomastigotes (metacyclogenesis) was compromised. A lower rate and number of metacyclic trypomastigotes was obtained from mutant parasites when compared to wild type. These data indicate that TcSTI-1 associates with HSP70 but, differently from other organisms, TcSTI-1 expression in exponentially growing cells was not stress-induced at this study conditions. Furthermore, reduced levels of TcSTI-1 decrease the rate of *in vitro* metacyclogenesis, indicating that this protein may participate in triggering the differentiation process in *T. cruzi*.

Key words: STI-1, stress, metacyclogenesis, *Trypanosoma cruzi*.

1 INTRODUÇÃO

Há mais de cem anos Carlos Chagas descreveu em seu artigo histórico o agente etiológico de uma nova entidade mórbida do homem (CHAGAS, 1909). Estudos em campo no interior de Minas Gerais, acompanhados de estudos laboratoriais *in vitro* e *in vivo*, permitiram determinar o inseto transmissor, os reservatórios e o quadro clínico da enfermidade, denominada mais tarde Doença de Chagas em sua homenagem. Além disso, este estudo descreveu em detalhes a morfologia e o ciclo evolutivo do parasita causador da doença, o protozoário *Trypanosoma cruzi*. A complexidade de seu ciclo de vida, apresentando diferentes formas evolutivas que se alternam entre dois tipos de hospedeiro (insetos e mamíferos, incluindo o homem) já na época despertou o interesse no estudo deste protozoário, não somente sob o aspecto patológico, mas também como modelo biológico peculiar.

Este parasita flagelado está situado no reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, sub-filo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma* e espécie *Trypanosoma cruzi* (LEVINE *et al.*, 1980). A ordem Kinetoplastida possui como característica uma estrutura intracelular diferenciada denominada cinetoplasto, que abriga uma massa concentrada de DNA extranuclear no interior da mitocôndria única do protozoário (de SOUZA, 2002). Além do *T. cruzi*, fazem parte também da família Trypanosomatidae outros protozoários causadores de doenças humanas e animais. O gênero *Leishmania* inclui diversas espécies causadoras dos três tipos principais de leishmanioses, a cutânea, a mucocutânea e a visceral (PISCOPO & AZZOPARDI, 2006). Os protozoários *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei*

rhodesiense são agentes causadores da tripanossomíase africana ou doença do sono, subespécies relacionadas ao *Trypanosoma brucei brucei*, causador de doença em animais (COX, 2004). O gênero *Trypanosoma* pode ser dividido em dois grupos, o Stercoraria e o Salivaria. O primeiro, inclui os tripanossomas que se desenvolvem no tubo digestivo do inseto vetor e cujas formas infectivas são liberadas através das fezes (por exemplo, *T. cruzi* e *T. lewisi*). O segundo, inclui tripanossomas que se desenvolvem inicialmente no tubo digestivo e cujas formas infectivas são encontradas nas glândulas salivares, podendo ser inoculadas mecanicamente (por exemplo, *T. brucei*, *T. congolense* e *T. rangeli*) (de SOUZA, 2000).

Embora os primeiros estudos a cerca da Doença de Chagas e seu agente causador tenham ocorrido no início do século XX, até hoje não existe vacina ou tratamento eficaz para a enfermidade. Milhões de pessoas na América Central e do Sul são afetadas pela doença, também conhecida como tripanossomíase americana, que se caracteriza por ser debilitante e incapacitante e se constitui como uma das principais causas de aposentadoria antecipada nas áreas de risco. Estima-se que 16 a 18 milhões de indivíduos estejam infectados nas Américas e que aproximadamente 25% da população da América Latina esteja sob risco de adquirir a doença (WHO, 2002).

A transmissão da Doença de Chagas ocorre principalmente de modo vetorial (80 a 90% dos casos), através da inoculação de formas infectantes do parasita em mucosas ou na pele não íntegra. Outras vias de transmissão incluem a transfusão sanguínea, e com menor frequência, a transmissão congênita, a infecção acidental em laboratório (BRENER, 1979) e por transplante de órgãos (DIAS, 1979; SCHMUNIS 2000). Recentemente, a ingestão de comida ou bebida contaminada com o inseto vetor ou as suas fezes vem sendo responsável pelo número

significativo de casos da doença na Amazônia brasileira (COURA *et al.*, 2002). Esporadicamente, há relatos de infecções adquiridas por via oral fora da região norte do Brasil, como o surto ocorrido em Santa Catarina devido à ingestão de caldo de cana contaminado, com 31 casos confirmados e cinco óbitos registrados (SVS, 2005).

1.1 O CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi é um parasita heteroxênico, cujo ciclo de vida envolve a passagem obrigatória em um hospedeiro invetebrado (inseto) e um hospedeiro vertebrado (mamífero). Os hospedeiros invertebrados são insetos hematófagos da família Reduviidae, subfamília Triatominae, popularmente conhecidos como barbeiros. Dentre as espécies de maior importância epidemiológica podemos citar *Rhodinus prolixus*, *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus* (SHERLOCK, 2000). Como hospedeiros vertebrados, foram descritos diversos mamíferos, como marsupiais, roedores e alguns carnívoros, além do homem (DIAS, 2000).

Durante o seu ciclo de vida (figura 1.1), *T. cruzi* sofre alterações morfológicas, ultra-estruturais, funcionais e bioquímicas (TYLER & ENGMAN, 2001) de acordo com o microambiente em que se encontra. Há dois tipos de formas replicativas do parasita, as formas amastigotas que se replicam no interior das células infectadas do hospedeiro mamífero, e as formas epimastigotas que se replicam no interior do trato digestivo dos insetos vetores. Estas formas replicativas se diferenciam nas formas tripomastigotas infectivas e não-replicativas, que são encontradas no sangue dos

mamíferos infectados (tripomastigotas sanguíneos) ou na porção posterior do trato digestivo dos insetos vetores (tripomastigotas metacíclicos).

O ciclo de vida no hospedeiro invertebrado inicia-se com a picada pelo inseto vetor de um mamífero infectado, que ingere formas tripomastigotas sanguíneas. No estômago do inseto, essas formas diferenciam-se em epimastigotas que migram ao longo do trato digestivo. No intestino, os epimastigotas se multiplicam e podem migrar e aderir às porções posteriores, cujo ambiente é pobre em nutrientes (KOLLIEN & SCHAUB, 2000). Neste caso, o estresse nutricional que estas formas sofrem é um dos sinais que desencadeiam o processo de diferenciação celular de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, denominado metaciclogênese. Esta diferenciação também depende da interação hidrofóbica entre o flagelo e a parede interna do aparelho digestivo do inseto (BONALDO *et al.*, 1988; KOLLIEN & SCHAUB, 2000). As formas tripomastigotas metacíclicas diferenciadas no intestino posterior são eliminadas nas fezes e urina do inseto.

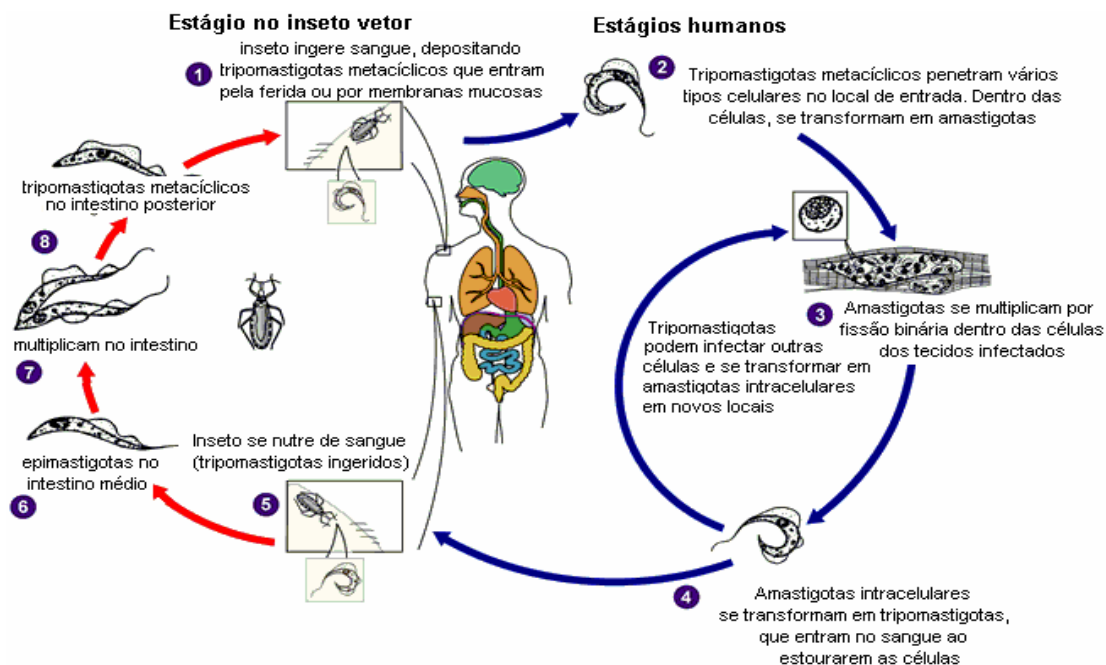


FIGURA 1.1 – CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi*. (modificado de www.dpd.cdc.gov/dpdx).

No hospedeiro vertebrado as formas tripomastigotas metacíclicas penetram na corrente sanguínea através de mucosas ou de ferimentos na epiderme. Estas formas são capazes de infectar células de diferentes tecidos onde se diferenciam em formas amastigotas intracelulares. Após sucessivas divisões no citoplasma da célula, as formas amastigotas se transformam em formas tripomastigotas (CARVALHO & De SOUZA, 1989; ANDREWS *et al.*, 1990). Ocorre então a ruptura da célula com liberação dos parasitas, que podem ou infectar outras células ou ser ingeridos pelo inseto vetor, fechando o ciclo (De SOUZA, 1984).

As diversas modificações morfológicas, funcionais e bioquímicas que ocorrem no parasita ao longo do seu ciclo de vida (TYLER & ENGMAN, 2001) refletem uma adaptação do parasita às distintas condições biológicas encontradas no interior dos hospedeiros. O estudo dos aspectos celulares, bem como dos mecanismos de regulação da expressão gênica envolvidos nesses processos foi auxiliado pela possibilidade de obtenção *in vitro* de uma maior quantidade de parasitas em diferentes formas evolutivas e em vários estágios de diferenciação.

1.2 O GENOMA DE *Trypanosoma cruzi*

Assim como outros organismos eucariotos, os tripanossomatídeos apresentam um genoma nuclear e um genoma mitocondrial. Conforme já mencionado anteriormente, o DNA mitocondrial nesses organismos se concentra no interior da organela, originando uma estrutura diferenciada denominada cinetoplasto. Este tipo de DNA, também conhecido como DNA do cinetoplasto ou kDNA, pode constituir até 30% do conteúdo total de DNA da célula. O kDNA é constituído por

dois tipos de moléculas circulares, os maxicírculos e minicírculos, que se encontram interligadas formando uma extensa rede entre si (SHAPIRO & ENGLUND, 1995). Existem aproximadamente 50 maxicírculos que contêm os genes codificadores de proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa e RNA ribossômico. Os milhares de minicírculos que formam o kDNA apresentam genes que codificam moléculas de RNA envolvidas na editoração do RNA (MOFFETT *et al.*, 1997).

O DNA nuclear em *T. cruzi* pode apresentar variáveis graus de condensação durante seu desenvolvimento, observando-se maior grau nas formas tripomastigotas do que em formas epimastigotas e amastigotas (ELIAS *et al.*, 2001). Contudo a análise do cariótipo é dificultada pelo fato dos cromossomos de tripanossomatídeos não se condensarem durante o ciclo celular (VICKERMAN & TETLEY, 1977). Os diferentes padrões de condensação do DNA observadas durante seu ciclo evolutivo podem ser associados a diferenças nas taxas de transcrição nessas formas (ELIAS *et al.*, 2001). Estudos utilizando a técnica de eletroforese de DNA em campo de pulsos alternados permitiram identificar bandas cromossômicas no parasita (SCHWARTZ & CANTOR, 1984). A partir dessas análises estimou-se que o genoma nuclear de *T. cruzi* cepa CL Brener compreendia 87 Mpb de DNA, distribuídos entre 30 a 40 bandas cromossômicas, cujos tamanhos variavam entre 0,45 e 4,0 Mpb (CANO *et al.*, 1995).

O sequenciamento do genoma de *T. cruzi* foi efetuado a partir da formação de um consórcio formado por três instituições: *The Institute for Genomic Research (TIGR)*, *Seattle Biomedical Research Institute (SBRI)* e *Karolinska Institutet*. A cepa eleita para o estudo foi a CL Brener, por ser bem caracterizada experimentalmente (ZINGALES *et al.*, 1997). Os dados do sequenciamento revelaram que o genoma da cepa compreende entre 106,4 e 110,7 Mpb, sendo que cerca de 50% é constituído

por sequências repetitivas. Estima-se que o genoma haplóide contenha 12.000 genes codificadores de proteínas, dos quais 18% seriam constituídos por famílias gênicas de proteínas de superfície associadas à mucina (MASP), transialidases, mucinas e glicoproteínas de superfície gp63 (EL-SAYED *et al.*, 2005).

1.3 A EXPRESSÃO GÊNICA E SUA REGULAÇÃO EM *Trypanosoma cruzi*

A expressão gênica em *T.cruzi* apresenta peculiaridades. Os genes eucariotos de modo geral apresentam regiões codificadoras (éxons) interrompidas por sequências não codificadoras (íntrons). O processo de transcrição iniciado a partir de sequências promotoras a montante da região codificadora origina um RNAm primário, que posteriormente sofre modificações nas porções 5' e 3' e remoção dos íntrons por um mecanismo de *cis-splicing*. De maneira distinta em tripanossomatídeos, as regiões codificadoras de proteínas não estão interrompidas por íntrons, com exceção do gene codificador da poli-A polimerase, único descrito na literatura (MAIR *et al.*, 2000).

Como em outros eucariotos, os três tipos de RNA polimerase (I, II e III) já foram descritos em tripanossomatídeos (CORNELISSEN *et al.*, 1989; CORNELISSEN *et al.*, 1990; KOCK & CORNELISSEN, 1991). A RNA polimerase I transcreve os genes para RNA ribossômicos, a RNA polimerase II transcreve os genes codificadores de proteínas e a RNA polimerase III transcreve moléculas de RNA nucleolar e de transferência. Entretanto, não foram encontradas sequências promotoras para a RNA polimerase II a montante dos genes codificadores de proteínas. Sequências promotoras foram descritas apenas para a RNA polimerase I

e para o gene do mini-éxon, transcrito pela RNA polimerase II de *T. cruzi* (DIETRICH *et al.*, 1993; NUNES *et al.*, 1997).

O processo de transcrição em tripanossomatídeos gera transcritos policistrônicos (VANHAMME & PAYS, 1995; TEIXEIRA, 1998), cujas unidades policistrônicas sofrem diversas modificações, distintas daquelas geralmente observadas nos RNAm eucaritóticos. A clivagem de RNAm individuais a partir do precursor policistrônico ocorre através de reação de *trans-splicing*, que adiciona uma sequência conservada de aproximadamente 39 nucleotídeos, denominada *spliced-leader* (SL) ou mini-éxon (ME), na porção 5' do transcrito (McCARTHY-BURKE *et al.*, 1989; NILSEN, 1992). Além desta modificação, ocorre a adição de uma cauda poli-A na extremidade 3'. Os mecanismos de *trans-splicing* e poliadenilação são acoplados (LEBOWITZ *et al.*, 1993). No entanto os genes de uma mesma unidade policistrônica podem apresentar grandes diferenças nos níveis de expressão, o que indica uma regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional (VANHAMME & PAYS, 1995).

Os eventos envolvidos na regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos parecem ser distintos dos comumente encontrados em organismos eucariotos, os quais envolvem o controle do início da transcrição pela RNA polimerase II. A ausência de sequências promotoras nos genes codificadores de proteínas, transcrição policistrônica e os níveis de RNAm distintos provenientes de mesma unidade policistrônica, indicam que a expressão gênica em tripanossomatídeos deva ser regulada por mecanismos pós-transcricionais. Além do processamento dos transcritos policistrônicos através de *trans-splicing* citado anteriormente, outros mecanismos que modulam a estabilidade dos RNAm, que controlam o acesso dos RNAm à maquinaria de tradução, e que regulam a

estabilidade e a degradação de proteínas, além de modificações pós-traducionais, também parecem estar envolvidos na regulação.

Vários trabalhos sugerem que a regulação da expressão de alguns genes em *T. cruzi* possa ocorrer durante a mobilização destes RNAm para o polissomo, resultando na expressão diferencial dessas moléculas. Este tipo de regulação foi evidenciado para os genes que codificam metaciclophenina, *cbp1*, uma proteína semelhante à ligadora de quitina, e *Tclmp4*, uma proteína associada com a pequena riboproteína nucleolar U3 (ÁVILA *et al.*, 2001; DALLAGIOVANNA *et al.* 2001; FRAGOSO *et al.*, 2003).

Outro mecanismo relacionado com a regulação da expressão gênica envolve a estocagem de RNAm no citoplasma, em estruturas conhecidas como grânulos de RNA. Por exemplo, em células mamíferas, RNAm não traduzidos concentram-se em grânulos de estresse que são agregados citoplasmáticos. Em leveduras, e em menor grau nas células dos mamíferos, o estresse induzido causa a inibição da síntese das proteínas e provoca acúmulo de RNAm reprimidos traducionalmente em *P-bodies*, que são *foci* citoplasmáticos que contêm várias proteínas envolvidas na repressão da tradução e degradação de RNAm. Os *P-bodies* e os grânulos de estresse são estruturas que participam do metabolismo de RNA, que podem ser diferenciadas entre si. Os *P-bodies* contêm componentes da maquinaria de degradação de RNA e podem ser observados em células submetidas a estresse ou não. Já os grânulos de estresse apresentam fatores de tradução e são observados somente em células sob condições de estresse (KEDERSHA *et al.*, 2005, ANDERSON & KEDERSHA, 2006). Recentemente, estudos desenvolvidos por Holetz e colaboradores (2007) identificaram a proteína Dhh1 em *T. cruzi*. Esta RNA helicase foi encontrada no citoplasma, tanto na forma livre quanto em grânulos, que variam em número em

resposta ao estresse nutricional e ao tratamento com drogas como cicloheximida e puromicina. Sugeriu-se que esses grânulos são relacionados a *P-bodies*, pois a proteína Dhh1 é característica desses grânulos e também devido a estas estruturas terem sido observadas também em células não submetidas a condições de estresse. Contudo, o papel da Dhh1 no metabolismo de RNA em *T. cruzi* ainda está sendo investigado.

Mecanismos de regulação pós-traducional também devem estar envolvidos na regulação gênica, uma vez que diversos genes codificadores de quinases foram identificados nos genomas de tripanossomatídeos (PARSONS *et al.*, 2005). Contudo, os processos de sinalização intracelular e sua relação com os mecanismos de regulação pós-traducional da expressão gênica foram pouco estudados até o momento nesses organismos.

Outro mecanismo relevante envolve a regulação da estabilidade e degradação de proteínas. As proteínas intracelulares de organismos eucariotos podem ser degradadas principalmente em complexos protéicos especializados conhecidos como proteassomos. As proteínas degradadas estão relacionadas a diversas funções celulares, como o ciclo celular, o reparo de DNA, o controle de transcrição, na modulação de receptores em vias de transdução de sinal e na apresentação de antígenos (GLICKMAN & CIECHANOVER, 2002). Em protozoários, estas estruturas estão sendo relacionadas aos processos de remodelamento morfológico e molecular sofridos por esses organismos durante seu desenvolvimento. Em *T. cruzi* foi demonstrado que a inibição da atividade dos proteassomos utilizando a droga lactacistina foi capaz de impedir a diferenciação de formas tripomastigotas em amastigotas (MUTOMBA *et al.*, 1997), bem como de formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas (CARDOSO *et al.*, 2008).

Estes achados sugerem que mecanismos de degradação seletiva de proteínas devam participar do controle dos processos de diferenciação que ocorrem ao longo do ciclo de vida do parasita.

1.4 ESTUDO DO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO DE *T. cruzi* DURANTE A METACICLOGÊNESE *in vitro*

Durante seu ciclo de vida, *T. cruzi* é exposto a diferentes condições ambientais, tanto no inseto vetor quanto no hospedeiro mamífero. Além disso, diversas modificações morfológicas, funcionais e bioquímicas ocorrem no parasita ao longo do seu ciclo de vida (TYLER & ENGMAN, 2001), refletindo uma adaptação precisa do parasita às distintas condições biológicas encontradas no interior dos hospedeiros. A compreensão dos diferentes processos de diferenciação celular durante o ciclo de vida do *T. cruzi* sempre foi alvo de muita atenção por parte dos pesquisadores. O estudo dos aspectos celulares, bem como dos mecanismos de regulação da expressão gênica envolvidos nesses processos, foi auxiliado pela possibilidade de obtenção *in vitro* de uma maior quantidade de parasitas em diferentes formas evolutivas e em vários estágios de diferenciação. A definição de condições químicas que mimetizam o processo de diferenciação que ocorre no inseto vetor da Doença de Chagas (CONTRERAS *et al.*, 1985; BONALDO *et al.*, 1988), usando-se como padrão *T. cruzi* clone Dm28c (CONTRERAS *et al.*, 1988), tornou a metaciclogênese *in vitro* um modelo apropriado para o estudo dos mecanismos envolvidos na regulação da diferenciação e da expressão gênica no parasita (GOLDENBERG, 1990).

O processo de metaciclogênese na porção posterior do intestino do inseto leva a diferenciação celular das formas epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicas e pode ser mimetizado *in vitro* em condições quimicamente definidas (CONTRERAS *et al.*, 1985a; BONALDO *et al.*, 1988). A manutenção do parasita na forma epimastigota pode ser feita em um meio de cultura rico em nutrientes (LIT: do inglês *Liver Infusion Tryptose*; CAMARGO, 1964). A metaciclogênese *in vitro* inicia-se após um estresse nutricional, que é efetuado pela transferência dos epimastigotas cultivados em meio LIT para o meio TAU (*triatomine artificial urine*), que mimetiza as condições iônicas encontradas na urina do inseto vetor. Após duas horas de incubação nesse meio, os parasitas são transferidos para o meio de diferenciação (TAU3AAG) que consiste no meio TAU suplementado com glicose e três aminoácidos (L-prolina, ácido L-glutâmico, ácido L-aspartico), onde permanecem por 96 horas. Nestas condições, cerca de 80% dos parasitas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (CONTRERAS *et al.*, 1985a; BONALDO *et al.*, 1988). A metaciclogênese *in vitro* permite a obtenção de tripomastigotas metacíclicos com as mesmas propriedades biológicas descritas para o parasita que se diferencia no inseto vetor (CONTRERAS *et al.*, 1988).

Estudos *in vitro* mostram que o estresse nutricional é um fator importante para a indução do processo de metaciclogênese. A incubação das formas epimastigotas em um meio desprovido de qualquer fonte de carbono (meio TAU) é necessária para iniciar o processo (CONTRERAS *et al.*, 1985; BONALDO *et al.*, 1988; CONTRERAS *et al.*, 1988). Além disso, a transformação *in vitro* das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas requer a adesão dos primeiros a um substrato (BONALDO *et al.*, 1988), semelhante ao que foi descrito para o processo de metaciclogênese no interior do triatomíneo (ZELEDON *et al.*, 1984; SCHAUB *et al.*,

1998). Os fenômenos de adesão e de diferenciação celular são interrompidos se, após um período de estresse nutricional, as condições nutricionais ideais forem restauradas. Deste modo, é possível que o estresse nutricional esteja associado à expressão de proteínas de adesão (FIGUEIREDO *et al.*, 2000).

No início da metaciclogênese, especialmente durante o estresse nutricional e o princípio do processo de adesão, deve ocorrer uma vasta reprogramação da expressão gênica (GOLDENBERG *et al.*, 1984) e foi possível observar que as alterações na expressão gênica precedem as alterações morfológicas ocorridas na metaciclogênese (CONTRERAS, *et al.*, 1985b). Durante a metaciclogênese podem ser observados genes de expressão transiente e regulação pós-transcricional (ÁVILA *et al.*, 2001; DALLAGIOVANNA *et al.*, 2001). Do mesmo modo, alterações bioquímicas e na composição da superfície celular podem ser observadas logo após o estresse nutricional (CONTRERAS *et al.*, 1985b; ESTEVES *et al.*, 1989; De ANDRADE *et al.*, 1991). Vinte e quatro horas depois do início do processo de diferenciação, as formas epimastigotas em diferenciação apresentavam-se resistentes à lise pelo complemento (CONTRERAS *et al.*, 1988), uma propriedade das formas tripomastigotas metacíclicas (NOGUEIRA, *et al.*, 1975).

O processo de metaciclogênese também pode ser influenciado por outros fatores. O aminoácido L-prolina utilizado como fonte de carbono e energia pode estimular a diferenciação (CONTRERAS *et al.*, 1985). Recentemente, um trabalho usando um análogo de prolina para inibir sua captação pelo parasita demonstrou que a L-prolina também é capaz de proteger *T. cruzi* do estresse oxidativo (MAGDALENO *et al.*, 2009). O AMPc é capaz de estimular a metaciclogênese (GONZALES-PERDOMO *et al.*, 1988) e foi encontrado na urina do inseto vetor *Rhodnius prolixus* (KOLLIEN & SCHAUB, 2000). A presença e a concentração dos

íons Ca^{2+} , K^+ , PO_4^- e HCO_3^- facilitam a metaciclogênese, enquanto o ânion Cl^- a impede (KRASSNER *et al.*, 1991).

1.5 DIFERENCIAÇÃO CELULAR E CONDIÇÕES DE ESTRESSE

No ciclo de vida dos tripanossomatídeos ocorre uma transição entre os insetos vetores e os hospedeiros mamíferos, associada a modificações morfológicas, bioquímicas e funcionais dos parasitas. A sobrevivência desses protozoários requer uma grande habilidade de adaptação a diversas situações ambientais, e que podem ser alteradas rapidamente. Dentre as diferentes condições ambientais a que os parasitas estão expostos nos hospedeiros, pode-se destacar as diferenças de temperatura, a disponibilidade de nutrientes e as alterações de pH. A exposição a tais condições de estresse e sua relação com os processos de diferenciação que ocorrem nos parasitas tem sido investigada.

Como visto anteriormente, a exposição de formas epimastigotas de *T. cruzi* a um ambiente pobre em nutrientes *in vivo* ou *in vitro* leva à diferenciação para as formas tripomastigotas metacíclicas (KOLLIEN & SCHAUB, 2000; CONTRERAS *et al.*, 1985; BONALDO *et al.*, 1988; CONTRERAS *et al.*, 1988). Além do estresse nutricional, condições de temperatura e de pH também parecem exercer influência na metaciclogênese *in vitro*. No trato intestinal do inseto vetor, o pH varia entre 5,9 e 8,9, de acordo com os períodos de jejum e de refeição de sangue (KOLLIEN *et al.*, 2001). Cerca de dois meses após a alimentação, a excreta de triatomíneos é ácida e a população de parasitas nas fezes é principalmente constituída de tripomastigotas metacíclicos (KOLLIEN & SCHAUB, 1998). Em outro estudo foi avaliado se a

exposição de formas epimastigotas a diferentes condições de estresse na metaciclogênese poderia levar à diferenciação para as formas tripomastigotas metacíclicas. O estresse de 2 horas que precede o processo de metaciclogênese *in vitro* foi realizado do modo convencional (estresse nutricional por incubação no meio TAU), ou por incubação em meio LIT a 37°C ou em meio LIT com pH 5,0. As duas últimas condições foram capazes de levar à diferenciação *in vitro* para as formas tripomastigotas metacíclicas, que apresentaram a mesma capacidade infectiva que as formas obtidas após exposição ao estresse nutricional (MONTEIRO-GÓES, 2008).

No processo de diferenciação *in vitro* das formas tripomastigotas metacíclicas para as formas amastigotas, denominada amastigogênese, a incubação dos parasitas a 37°C em um meio rico em proteínas é suficiente para promover a diferenciação e obter quantidade significativa de amastigotas com morfologia e propriedades biológicas e antigênicas similares às aquelas de amastigotas intracelulares (CONTRERAS *et al.*, 2002). De modo semelhante, a incubação de tripomastigotas por 2 horas em um meio com pH 5,0 leva à transformação em amastigotas com características equivalentes às formas isoladas *in vivo* (TOMLINSON *et al.*, 1995).

A exposição a condições de estresse também parece ser relevante para os processos de diferenciação de outros tripanossomatídeos. Na diferenciação celular *in vitro* de formas sanguíneas para formas procíclicas de *T. brucei*, a incubação em meio com pH 5,5 a 37 °C por 2 horas não só acelerou a transformação das formas sanguíneas (presentes em mamíferos) longas para as curtas, mas também permitiu a obtenção de formas procíclicas (presentes no inseto) mesmo na ausência de citrato/cis-aconitato (ROLIN *et al.*, 1998). O protozoário do gênero *Leishmania*

também tem um ciclo de vida heteroxênico, envolvendo formas promastigota extracelulares no aparelho digestivo do inseto vetor e formas amastigotas intracelulares no hospedeiro mamífero. As formas promastigotas são transmitidas pelo inseto ao mamífero, onde são rapidamente fagocitadas. Dentro do fagolisossomo, ou vacúolo parasitóforo, podem sobreviver ao ambiente ácido desta organela e se transformar nas formas amastigotas (BURCHMORE & BARRET, 2001). Foi verificado que a combinação de redução do pH e elevação da temperatura é capaz de induzir a transformação das formas promastigotas em amastigotas, além de alterar a expressão de vários genes nas formas promastigotas deste parasita (ZILBERSTEIN *et al.*, 1994).

O ciclo de vida envolvendo estágios evolutivos distintos que se alternam entre insetos vetores de sangue frio e hospedeiros mamíferos de sangue quente é comum a vários protozoários parasitas. Diversos estudos realizados apontam que as diferentes condições de estresse enfrentadas no trânsito entre esses distintos ambientes possam estar envolvidas nos processos de diferenciação. Portanto, é provável que um mecanismo de diferenciação induzido por estresse esteja envolvido no disparo desse processo nesses organismos.

1.6 RESPOSTA CELULAR AO ESTRESSE POR PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSPs)

A exposição das células a variações ambientais, como mudanças de temperatura ou disponibilidade de nutrientes, exige uma capacidade de responder rapidamente a tais alterações para garantir sua sobrevivência e a manutenção da

homeostase. Experimentos realizados por Ritossa e colaboradores (1962) utilizando larvas de *Drosophila melanogaster* expostas a condições de choque térmico mostraram que a elevação da temperatura induzia a expressão de um conjunto específico de genes. Mais tarde os produtos desses genes foram identificados como *heat shock proteins* (HSPs) ou proteínas de choque térmico (TISSIER *et al.*, 1974). Outros trabalhos mostraram que as HSPs estão entre as proteínas mais conservadas e que sua expressão pode ser induzida em outros organismos. Apesar da expressão de nem todas as HSPs ser induzida por estresse, todavia aquelas que são, podem responder a diferentes tipos de estresses, tais como temperaturas extremas, depleção de energia celular, concentrações extremas de íons, gases e várias substâncias tóxicas (FEDER & HOFMANN *et al.*, 1999). Induzidas por uma gama variada de estresses, desde temperatura ou exposição à luz UV, até hipóxia, inflamação, infecção ou poluição ambiental, as HSPs (também chamadas de proteínas de estresse) desempenham variadas funções nos organismos.

A maioria das proteínas de choque térmico são chaperonas, proteínas que compartilham a propriedade comum de auxiliar a montagem de outras proteínas (HIGHTOWER, 1991; HARTL, 1996). A razão para este comportamento é que o enovelamento de proteínas é severamente afetado por calor e, portanto, as chaperonas agem para reparar os danos causados por enovelamento inadequado. As HSPs funcionam como chaperonas para orientar os estados conformacionais críticos no dobramento, na translocação e na montagem de proteínas recém-sintetizadas. Embora a maioria das proteínas recém sintetizadas possa dobrar na ausência de chaperonas, uma minoria estrita necessita de seu auxílio (HARTL, 1996; ELLIS, 2007). As principais classes de HSPs são agrupadas de acordo com suas massas moleculares: pequenas HSPs (sHSPs), HSP40,

HSP60, HSP70, HSP90 e HSP100 (HIGHTOWER, 1991), com representantes tanto em organismos eucariotos quanto procariotos.

As pequenas HSPs (sHSPs) pertencem a uma família com massa molecular entre 12 e 43 kDa, com representantes procarióticos (GroES, GrpE) e eucarióticos (HSP10, alfa-cristalina, HSP25/27). Podem formar estruturas multiméricas e exibir variadas funções celulares, como conferir a termotolerância em células *in vivo* e agir como chaperonas moleculares *in vitro*. As sHSPs interagem com proteínas propensas a agregação para promover posteriormente a desagregação. No cristalino, a sHSP alfa-cristalina pode se comportar como uma chaperona sequestrando proteínas não enoveladas, e inibindo a agregação e insolubilização, mantendo assim a transparência (VAN MONTFORT *et al.*, 2001). A HSP27 humana e a HSP25 murina formam oligômeros que atuam como chaperonas *in vitro* e protegem as células do choque térmico e do estresse oxidativo, além de participar do processo de polimerização e despolimerização de actina (GERTHOFFER & GUNST, 2001).

A HSP60 (GroEL em *Escherichia coli*) é uma enovelase ATP-dependente. GroEL, juntamente com a sua co-chaperona GroES, forma um grande complexo de aproximadamente 1 MDa em *E. coli* (RANSON *et al.*, 2006). Os homólogos HSP60 em eucariotos estão localizados em mitocôndrias e cloroplastos.

A HSP70 (DnaK em *E. coli*) é talvez, dentre as chaperonas, a melhor caracterizada. As proteínas HSP70 são auxiliadas por proteínas HSP40 (DNAJ em *E. coli*), que aumentam a atividade de ATPase das HSP70s. Embora uma definição precisa do mecanismo ainda não tenha sido determinada, sabe-se que as HSP70s tem uma alta afinidade por proteínas desdobradas quando ligada a ADP, e uma baixa afinidade quando ligada a ATP (MAYER & BUKAU, 2005). HSP70 também

atua como chaperona em mitocôndrias e cloroplastos em eucariotos (BOORSTEIN *et al.*, 1994).

As proteínas HSP100 (Clp a família em *E. coli*) formam grandes estruturas hexaméricas com atividade de desenovelase na presença de ATP (SCHIRMER *et al.*, 1996). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram sua habilidade para direcionar e desenovelar proteínas mal dobradas (WAWRZYNOW *et al.*, 1996). Algumas destas chaperonas, como por exemplo a ClpA e a ClpX que formam complexos associadas com a serina protease ClpP, ao invés de catalisar a renaturação de proteínas, são responsáveis pela destruição de proteínas mal dobradas (KWON *et al.*, 2004).

A chaperona HSP90 foi identificada como uma das proteínas de choque térmico envolvidas na resposta ao estresse mais conservada entre os organismos (RITOSSA, 1996; WESTERHEIDE & MORIMOTO, 2005). A HSP90 é uma proteína altamente abundante, constituindo cerca de 1-2% do total de proteínas na maioria dos tecidos não submetidos a condições de estresse (WELCH, 1991; WELCHAND FERAMISCO, 1982). De modo distinto, a homóloga bacteriana da HSP90 (HtpG) é expressa em níveis baixos e não é essencial para a célula (BARWELL & CRAIG, 1988). Além de auxiliar o enovelamento e prevenir a agregação de proteínas mal dobradas, comum às outras chaperonas (WIECH *et al.*, 1992), também facilita a maturação e/ou ativação de mais de 100 substratos (“proteínas clientes”) envolvidos na transdução de sinal e regulação da transcrição (BROWN *et al.*, 2007). Dentre as proteínas clientes, podem-se citar tirosina-quinases transmembrana (Her-2, EGFR), proteínas sinalizadoras metaestáveis (Akt, Raf-1 e IKK), proteínas sinalizadoras mutadas (p53, v-Src), proteínas quiméricas de sinalização (Bcr-Abl), reguladores do ciclo celular (Cdk4, Cdk6), e receptores de esteróides (andrógenos, estrógeno e progesterona) (KAMAL *et al.*, 2004). A HSP90 interage com as proteínas clientes em

uma via ATP-dependente que é dependente de chaperonas adicionais como HSP70 e HSP40, bem como de um número de co-chaperonas, como imunofilinas, e as proteínas STI1/Hop, p50 (Cdc37) e AHA1, que regulam a função da HSP90 (PEARL & PRODROMOU, 2006).

A exposição a condições de choque térmico faz parte do ciclo de vida dos tripanossomatídeos. A alteração na temperatura de 25 a 28°C para 37°C, quando transitam do hospedeiro invertebrado para o hospedeiro mamífero, é acompanhada por indução das HSPs (MARESCA & CARRATU, 1992). O primeiro gene codificador de HSP60 de tripanossomatídeos foi caracterizado em *T. cruzi* (GIAMBIAGI DE MARVAL, *et al.*, 1993). Posteriormente, o cDNA que codifica uma HSP60 de *T. brucei* foi caracterizado, e através do uso de anticorpo específico, foi demonstrado que a HSP60 é duas a quatro vezes mais abundante nas formas procíclicas (formas do inseto) do que nas tripomastigotas sanguíneas (formas do mamíferos) (BRINGAUD *et al.*, 1995).

Em *Leishmania major* foram caracterizados 4 genes codificadores de HSP70, cuja expressão foi aumentada *in vitro* e *in vivo* em resposta ao estresse térmico (LEE *et al.*, 1988). A diferença de temperatura entre os hospedeiros induz uma resposta ao estresse em *T. brucei*, mostrada pela maior quantidade de RNAm para homólogos a HSP70 nas formas sanguíneas do que nas formas procíclicas (no inseto) (VAN DER PLOEG *et al.*, 1985). De modo semelhante, a incubação de células a 37°C aumentou a quantidade de RNAm de HSP70 em *T. cruzi*, sendo maior este acúmulo na fração associada a polissomos do que na fração de RNA total (De CARVALHO *et al.*, 1990). Outro trabalho, realizado por Requena e colaboradores (1992), também demonstrou a indução da expressão de HSP70 em *T. cruzi*, após 2 horas de incubação a 37°C, tanto em nível de RNAm quanto em nível

protéico, sendo que várias isoformas da proteína foram expressas constitutivamente a 28 °C e algumas delas apresentaram um padrão específico de indução de 37 °C. Análises comparativas das formas citoplasmática e mitocondrial de HSP70 de *T. cruzi* revelaram uma indução leve de ambas as formas após 3 horas de choque térmico (OLSON *et al.*, 1994). Neste trabalho também foi possível verificar que durante o estresse térmico, a forma mitocondrial de HSP70 permanece na organela, enquanto a forma citoplasmática se acumula no núcleo dos parasitas. Uma recente revisão descreve que *T. cruzi* possui onze sequências completas codificadoras de proteínas HSP70 citosólicas típicas e uma sequência completa codificadora da isoforma mitocondrial (LOUW *et al.*, 2010).

Dragon e colaboradores (1987) analisando bibliotecas de cDNA de *T. cruzi* identificaram um gene homólogo a HSP90 de *Saccharomyces cerevisiae*. Os genes codificadores de HSP90, também foram caracterizados em *Leishmania* sp. (SHAPIRA & PEDRAZA, 1990) e *T. brucei* (MOTTRAM *et al.*, 1989). Apesar da HSP90 de *T. cruzi* apresentar 63% de similaridade com a HSP90 de *S. cerevisiae*, a proteína do parasita foi capaz de complementar funcionalmente a levedura (PALMER *et al.*, 1995). Outro resultado interessante foi obtido a partir da inativação da HSP90 de *L. donovani*, com o uso das drogas geldamicina e radicicol, que se ligam ao sítio de ligação do ATP da HSP90 e inibem sua atividade chaperona (WIESGIGL & CLOS, 2001). A inativação da HSP90, além de induzir uma resposta ao estresse e bloquear o crescimento celular, foi capaz de induzir a diferenciação das formas promastigotas (presentes no inseto) para as formas amastigotas (presente no mamífero). Por outro lado, em formas epimastigotas de *T. cruzi* a inibição de HSP90 por geldanamicina apesar de promover o bloqueio da divisão

celular e induzir a resposta ao estresse térmico, não promove a diferenciação celular (GRAEFE *et al.*, 2002).

Embora a indução da expressão de HSPs seja observada em diferentes fases do ciclo de vida dos tripanossomatídeos, ainda não está claro se essa indução faz parte do programa de diferenciação desses parasitas, ou seja apenas uma resposta às mudanças do ambiente (FOLGUEIRA & REQUENA, 2007). Diferente de leveduras e mamíferos, onde os multi-complexos de HSPs e co-chaperonas são mais estudados e por isso melhor compreendidos, nos tripanossomatídeos ainda são necessários muitos estudos sobre essas HSPs e co-chaperonas, para que seja possível estabelecer suas funções nas diversas fases do ciclo de vida desses parasitas.

1.7 A PROTEÍNA INDUZIDA POR ESTRESSE (STI-1)

A proteína STI-1 (do inglês: *Stress Induced Protein 1*) foi isolada e caracterizada pela primeira vez a partir de experimentos de busca por proteínas envolvidas em resposta ao estresse térmico em *S. cerevisiae*. A exposição das células a condições de choque por calor induz a expressão do gene *sti-1* em levedura. A adição da droga canavanina, um análogo do aminoácido arginina, também foi capaz de induzir a expressão em um nível semelhante ao observado após aumento de temperatura. Em virtude dessas características e da ausência de relação com a sequência de nucleotídeos e aminoácidos dos genes de choque térmico clássicos, o gene *sti-1* foi categorizado como “induzido por estresse”. (NICOLET & CRAIG, 1989).

Em 1992, Honoré e colaboradores clonaram o gene codificador da proteína humana sensível à transformação (IEF SSP 3521), que havia sido identificada em um estudo anterior com fibroblastos humanos infectados pelo vírus SV40, e nos quais apresentou um aumento de 2 vezes no seu nível em comparação com as células não transformadas (CELIS *et al.*, 1990). Por ensaios de *Northen blot* verificou-se que ocorria um aumento também nos níveis de RNAm para a proteína nas células transformadas. Análises da sequência de aminoácidos revelaram que a proteína apresentava 42% de identidade com a STI-1 isolada de levedura (HONORE *et al.*, 1992)

A partir de lisados de reticulócito de coelho foi purificada uma proteína de 66 kDa que se associa com HSP70 e promove sua reciclagem por catalisar a troca de ADP por ATP na HSP70. Por este motivo, a proteína foi denominada fator de reciclagem para HSP70 (RF-HSP70) (GROSS & HESSEFORT, 1996). Em outro trabalho, Smith e colaboradores (1993) isolaram, a partir de imunopurificação de proteínas de células de oviduto de galinha, uma proteína de 60 kDa (p60) associada a HSP90 e HSP70, que apresentava similaridade com a IEF SSP 3521.

Proteínas homólogas à STI-1 de levedura também foram caracterizadas em camundongo e soja, onde também foi observado aumento nos níveis de RNAm do gene *sti-1* após exposição *in vitro* das células a condições de choque por calor (LASSLE *et al.*, 1997; HERNANDEZ *et al.*, 1995). A indução da expressão da proteína STI-1 de soja foi observada tanto em condições de choque por calor a 40 °C, quanto de choque por frio a 12 °C (ZHANG *et al.*, 2003).

Recentemente foi caracterizada uma homóloga a STI-1 em *Caenorhabditis elegans* que apresenta 53% de similaridade com a homóloga humana. A proteína foi encontrada em diferentes órgãos deste metazóário e a indução de sua expressão foi

observada, tanto em nível de RNAm quanto protéico, em resposta à elevação de temperatura de 20 para 30 °C (SONG *et al.*, 2009).

Em protozoários foi caracterizada uma homóloga da STI-1 em *Leishmania major*. Tanto nas formas promastigotas, quanto nas amastigotas, o gene é expresso constitutivamente, mas a indução de sua expressão foi observada quando a temperatura de culturas promastigotas foi elevada de 26 para 37 °C. Contudo o aumento paralelo nos níveis protéicos foi observado somente para STI-1 nascentes. A interação com as proteínas HSP70 e HSP90 também foi verificada nesse organismo, semelhante às outras homólogas de STI-1 (WEEB *et al.*, 1997).

Outros fatores, além de choque térmico, também são capazes de induzir a expressão de STI-1. Como descrito anteriormente, a indução da expressão do gene *sti-1* foi observada em fibroblastos humanos quando transformados com o vírus SV-40 (HONORE *et al.*, 1992). A exposição de macrófagos de camundongo e hamster a lipopolissacarídeos bacterianos também foi capaz de aumentar os níveis de RNAm do gene *sti-1* (HEINE, *et al.*, 1999).

Apesar de ser caracterizada a indução da STI-1 sob condições de estresse em diversos organismos, pouco se sabe sobre seu real papel na manutenção da homeostase celular. Visando contribuir na compreensão de sua função celular, alguns experimentos de *knockout* e *knockdown* do gene *sti-1* foram realizados. A deleção do gene em leveduras não afetou o crescimento entre 23 e 30°C, contudo a exposição a condições de choque térmico, com temperaturas de 16 e 39°C, inibiram a proliferação celular (NICOLET & CRAIG, 1989). Ensaios de RNA de interferência em células tronco de camundongos indicaram que o silenciamento de STI-1 leva à perda de pluripotência, devido à diminuição da fosforilação e da translocação nuclear da proteína Stat3, uma transdutora de sinal e ativadora da transcrição

(LONGSHAW *et al.*, 2008). Um mutante que apresenta uma deleção parcial do gene *sti-1* isolado em *C. elegans* apresentou um decréscimo na fertilidade e na termotolerância sob estresse térmico. Além disso, foi observada uma diminuição de cerca de 70% na expectativa de vida nos vermes mutantes, que foi recuperada em animais transgênicos que expressavam *sti-1* sob controle de seu promotor endógeno (SONG *et al.*, 2009).

1.7.1 Localização celular da proteína STI-1

Em estudos realizados em mamíferos foi observado que a proteína STI-1 está localizada predominantemente no citoplasma (LASSLE *et al.*, 1997), contudo também pode ser observada no Aparelho de Golgi (HONORE *et al.*, 1992), na membrana celular (ZANATA *et al.*, 2002) e no núcleo (LONGSHAW *et al.*, 2004).

Os experimentos de imunolocalização em fibroblastos humanos mostraram nas células transformadas com vírus SV-40 a presença da proteína principalmente no núcleo, enquanto nas células não transformadas foi localizada no aparelho de Golgi e em pequenas vesículas no citoplasma das células (HONORE *et al.*, 1992). Em um estudo recente, a proteína STI-1 foi encontrada também em grânulos de estresse no citoplasma de células humanas, juntamente com outras co-chaperonas que se associam à HSP90 (PARE *et al.*, 2009).

A STI-1 de camundongo foi identificada como uma proteína citoplasmática (LASSLE *et al.*, 1997). Todavia, foi observada uma pequena fração ligada à proteína príon celular (PrPC) na face citoplasmática da membrana celular (ZANATA *et al.*, 2002), apesar da ausência de qualquer domínio transmembrana ou de um peptídeo sinal de transporte para a membrana (LASSLE *et al.*, 1997). Foi verificado que a

interação da STI-1 com PrPC promove neuroproteção contra a morte celular (ZANATA *et al.*, 2002). O tratamento de fibroblastos de camundongo com Leptomicina B, uma droga que inibe a exportação nuclear, resultou no acúmulo da proteína STI-1 no núcleo (LONGSHAW *et al.*, 2004). De modo semelhante, a exposição dessas células a condições de choque por calor também provocou a translocação da proteína para o núcleo (DANIEL *et al.*, 2008). Embora diversos estudos já tenham sido feitos para investigar as funções da STI-1, seu papel em diferentes locais dentro das células e na resposta a condições de estresse ainda precisa ser esclarecido.

1.7.2 Interação da STI-1 com HSP70 e HSP90

A proteína STI-1, também conhecida como Hop (do inglês: *HSP70/HSP90 organizing protein*), é uma co-chaperona que atua mediando a formação de um heterocomplexo entre as proteínas de choque térmico HSP 70 e HSP90, que parece desempenhar importante papel nas redes de transdução de sinal, no controle do ciclo celular e na degradação de proteínas (YOUNG *et al.*, 2001). A interação entre as proteínas ocorre através de domínios chamados TPR (do inglês: *tetratricopeptide repeat*), que caracterizam as homólogas da proteína STI-1 já descritas em outros organismos (SCHEUFLER *et al.*, 2000). Na figura 1.2 são mostrados os domínios presentes em STI-1 caracterizadas em leveduras, drosófilas, humanos e *C. elegans*.

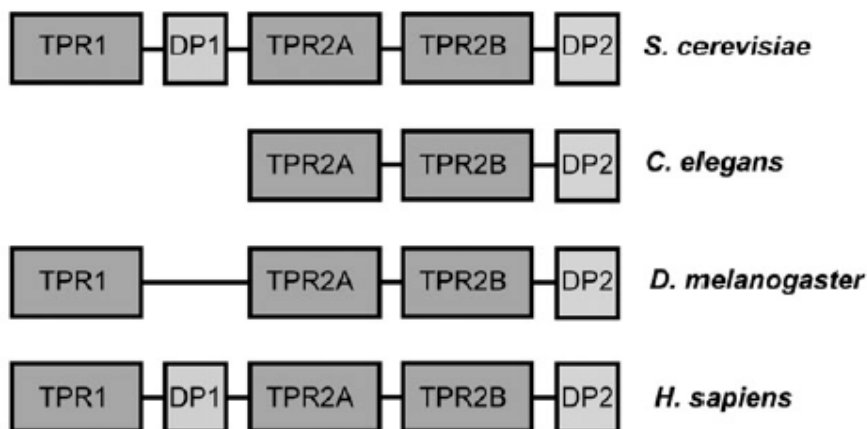


FIGURA 1.2 – DOMÍNIOS PRESENTES NAS PROTEÍNAS STI-1/Hop DE DIFERENTES ORGANISMOS (adaptado de GAISER *et al.*, 2009)

Estão destacados os motivos tetratricopeptídeo (TPR) e os motivos de ligação DP1 e DP2.

A ligação da HSP70 é mediada pelo domínio TPR amino-terminal (TPR1), enquanto o domínio TPR central (TPR2A) é essencial para a ligação da HSP90. O domínio TPR1 interage com o motivo IEEVD presente na porção C-terminal da HSP70. O domínio TPR2A interage com o motivo MEEVD presente na porção C-terminal da HSP90 (YOUNG *et al.*, 1998; SCHEUFLER *et al.*, 2000; BRINKER *et al.*, 2002). O domínio TPR carboxi-terminal (TPR2B) da STI-1 parece envolvido com a interação de ambas HSPs (FLOM *et al.*, 2007).

Além dos domínios TPR, as proteínas Hop caracterizadas contêm dois domínios de ligação: um entre TPR1 e TPR2A, chamado DP1, e outro na porção C-terminal da proteína, chamada DP2. O domínio DP1 está ausente na STI-1 de drosófila e a homóloga de STI-1/Hop em *C. elegans* não apresenta os domínios TPR1 e DP1 (CARRIGAN *et al.*, 2005; GAISER *et al.*, 2009). Embora haja interação da STI-1 de *C. elegans* com as proteínas HSP70 e HSP90, a formação do

multicomplexo é prejudicada pela competição de ambas as chaperonas pelos domínios TPR (GAISER *et al.*, 2009).

Em solução a proteína STI-1/Hop tem se comportado como dímero, tanto em leveduras quanto em mamíferos (CARRIGAN *et al.*, 2004; PRODOMOU *et al.*, 1999). Além disso, estudos observaram que é a forma dimérica da co-chaperona que se liga a dímeros da HSP90 (CARRIGAN *et al.*, 2004).

Além de sua atividade como adaptadora molecular, a STI-1 também pode modular a atividades dessas HSPs. Em leveduras a STI-1 é capaz de estimular a atividade de ATPase da HSP70 (WEGELE *et al.*, 2003) e inibir fortemente a atividade de ATPase da HSP90 (PRODOMOU *et al.*, 1999), em contraste com a homóloga de mamíferos, que não inibe a hidrólise de ATP da HSP90 humana (McLAUGHLIN *et al.*, 2002). A inibição da atividade ATPase da HSP90 pela STI-1 ocorre por um mecanismo não competitivo, em que a interação da HSP90 com STI-1 impede uma mudança crucial na conformação da HSP90, que tem se mostrado essencial para a hidrólise de ATP (RICHTER *et al.*, 2003).

Em 2008, Onuoha e colaboradores propuseram um modelo geral de funcionamento desse multicomplexo chaperona/co-chaperona, que é mostrado na figura 1.3 a seguir.

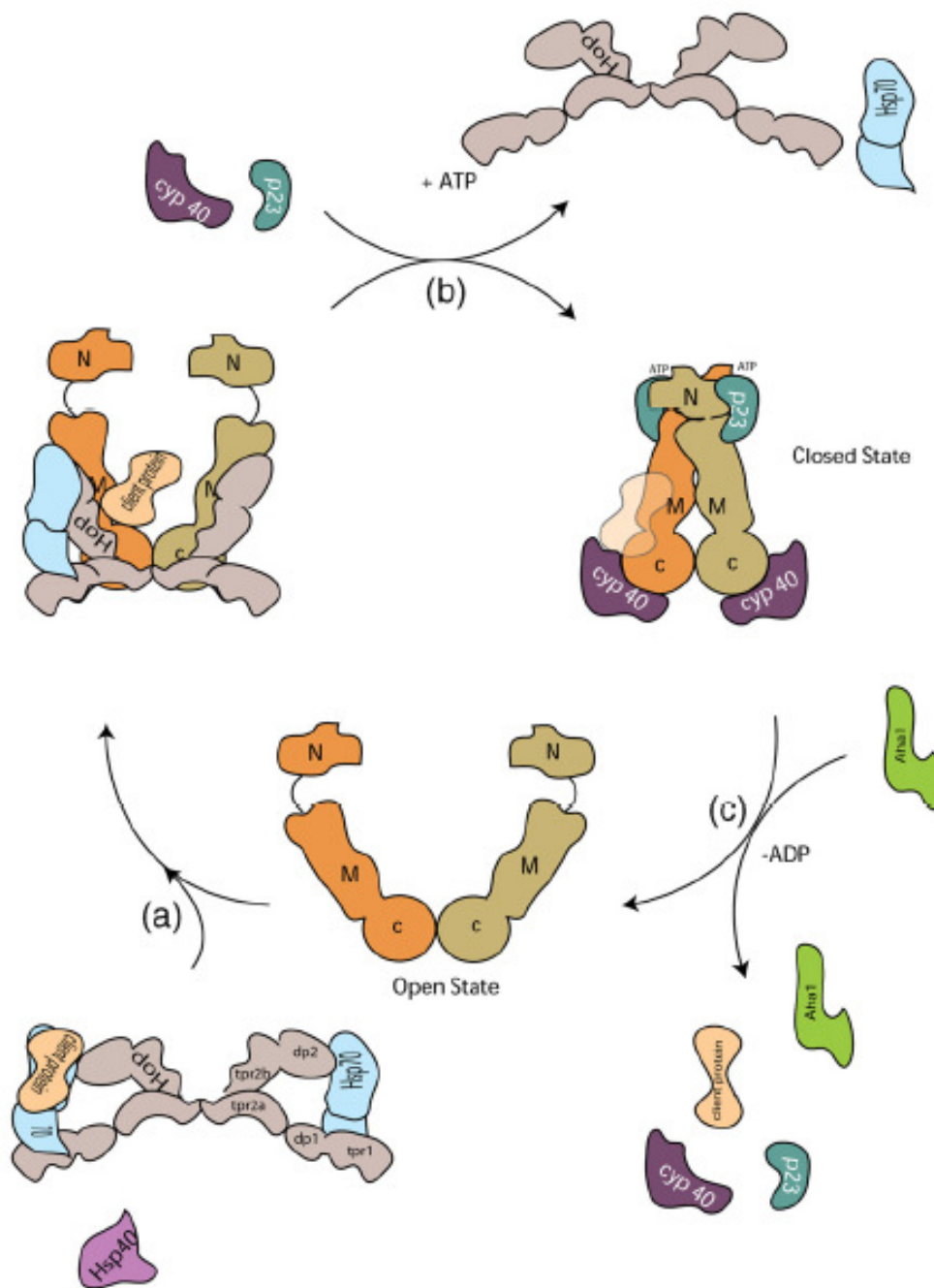


FIGURA 1.3 – MODELO GERAL DA MONTAGEM DO HETEROCOMPLEXO DE CHAPERONAS E CO-CHAPERONAS (adaptado de ONUOHA *et al.*, 2008)

São mostrados o dímero HSP90 (laranja e marrom claro), o dímero Hop (cinza), HSP70 (azul claro), HSP40 (lilás), cyp40 (roxo), p23 (verde escuro), Aha1 (verde claro) e a proteína cliente (rosa-salmão). C: domínio C-terminal, M: domínio central, N: domínio N-terminal.

O modelo propõe de modo detalhado como a co-chaperona Hop auxilia na apresentação de proteínas clientes para a HSP90, alinhando a proteína cliente ligada a HSP70 com o domínio central da HSP90. É provável que Hop liga-se à monômeros de HSP90 na forma de uma pinça, interagindo com os resíduos no domínio central (M) de HSP90 e evitando a hidrólise de ATP, possivelmente pela prevenção da associação dos domínios central (M) e N-terminal (N) em monômeros da HSP90 (ONUOHA *et al.*, 2008). Sugere-se que os domínios TPR1 e DP2 de Hop se aproximam um do outro, permitindo a ligação da HSP70 a ambos os domínios simultaneamente, explicando porque estudos anteriores haviam mostrado a necessidade de ambos os domínios para ligação da HSP70 a Hop (HERNANDEZ *et al.*, 2002).

Na etapa inicial (a), a forma aberta da HSP90 é carregada com a proteína cliente com o auxílio da Hop que alinharia a proteína cliente ligada a HSP70 com o domínio central (M) de HSP90. Os domínios TPR1 e DP2 da Hop parecem aproximar-se um do outro e assim permitir a ligação a HSP70. A Hop na forma dimérica pode se ligar a ambos os monômeros da HSP90, através dos domínios TPR2b e domínios DP2, sob a forma de uma pinça, interagindo com os resíduos no domínio central da HSP90 e assim prevenindo a hidrólise de ATP (por prevenir a associação dos domínios N-terminal e central dos monômeros da HSP90). Após a ligação da HSP90 ao ATP (b), o complexo de HSP90-Hop é enfraquecido e, juntamente com a ligação de outras co-chaperonas, como a Cyp40 ou a p23, Hop é deslocado do complexo da HSP90. A ligação do ATP à HSP90, em seguida, provoca mudanças conformacionais nos domínios N-terminal e central da HSP90, resultando na dimerização do domínio N-terminal e formação do estado fechado da HSP90. Este estado fechado é estabilizado pela p23. O ciclo é completado (c) pela hidrólise

do ATP, que pode ser desencadeada pela liberação de Hop ou ligação da proteína cliente ou da proteína AHA1, resultando na ativação e posterior liberação da proteína cliente e restauração do estado aberto de HSP90 (ONUOHA *et al.*, 2008).

O papel do multicomplexo HSP70/HSP90/Hop na montagem e maturação funcional de complexos de receptores de hormônios esteróides tem sido extensivamente estudado e está bem caracterizado. O receptor de esteróide inicialmente se associa com HSP40 e HSP70 e em seguida, através de uma interação entre Hop e ambas as HSP70 e HSP90, o receptor é passado para HSP90. A ligação de ATP à HSP90 resulta na dissociação de Hop e interação subsequente de outras co-chaperonas, como p23 e peptidil-prolil isomerases como FKBP52 ou Cyp40. Acredita-se que a hidrólise de ATP pela HSP90 resulte em mudanças conformacionais que levam à ativação da proteína cliente, no caso de receptores de esteróides, aumentando a afinidade pelo hormônio (SMITH & TOFT, 1993). Portanto, a co-chaperona Hop é importante para passagem de proteínas clientes da HSP70 para a HSP90 e potencialmente aumenta a taxa de maturação do receptor (MORISHIMA *et al.* 2000).

Além da participação na montagem e maturação de receptores de esteróides, esse multicomplexo chaperona é capaz de reconstituir a atividade da transcriptase reversa do hepadenovírus *in vitro* (HU *et al.* 2002), sugerindo que esse sistema pode ser usado para mediar vários processos biológicos dependentes da função HSP90 (PRATT & TOFT, 2003).

1.7.3 Interação da STI-1 com a proteína prion celular e a sobrevivência e diferenciação celular

A proteína príon celular (PrPC) é uma glicoproteína da superfície celular ancorada à membrana ligada a glicosilfosfatidilinositol (GPI), expressa de modo abundante no cérebro. Estudos tem atribuído diversas funções celulares a PrPC e sugerido que a perda de sua função poderia contribuir para o desenvolvimento das doenças priônicas (AGUZZI & HEIKENWALDER, 2006).

Dentre as proteínas que interagem com PrPC, pode-se destacar a interação específica com a proteína STI-1 (ZANATA *et al.*, 2002). Experimentos em camundongos mostraram que uma pequena parte da STI-1 está presente na membrana celular e que sua interação com a PrPC apresenta alta afinidade, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, a interação da PrPC com a STI-1, ou com o peptídeo que apresenta o domínio de ligação na STI-1, induz sinais de neuroproteção que resgatam neurônios da retina da apoptose (ZANATA *et al.*, 2002). Este mecanismo de neuroproteção parece ocorrer através de uma via AMPc/proteína quinase A (PKA) -dependente (CHIARINI *et al.*, 2002).

Estudos com neurônios do hipocampo demonstraram que a STI1 é altamente expressa nesse tecido e que a adição de uma forma recombinante da STI-1 nas culturas celulares induz a neuritogênese e a neuroproteção. Estes mecanismos atuam em neurônios do hipocampo pelas vias de sinalização intracelular de quinase ativada por mitógeno (MAPK) e de proteína quinase A (PKA), respectivamente (LOPES *et al.*, 2005). Em 2007, Lima e colaboradores mostraram que os astrócitos secretam a proteína STI1 em no meio extracelular, reforçando a sugestão de que esta chaperona poderia atuar como um fator autócrino no tecido nervoso.

Outro estudo recente forneceu mais evidências de que a STI1 seria uma fator

trófico capaz de interagir com PrPC e modular a sobrevivência e a diferenciação astrocitária (ARANTES *et al.*, 2009). A figura 1.4 mostra um esquema das interações funcionais da STI-1 nessas células.

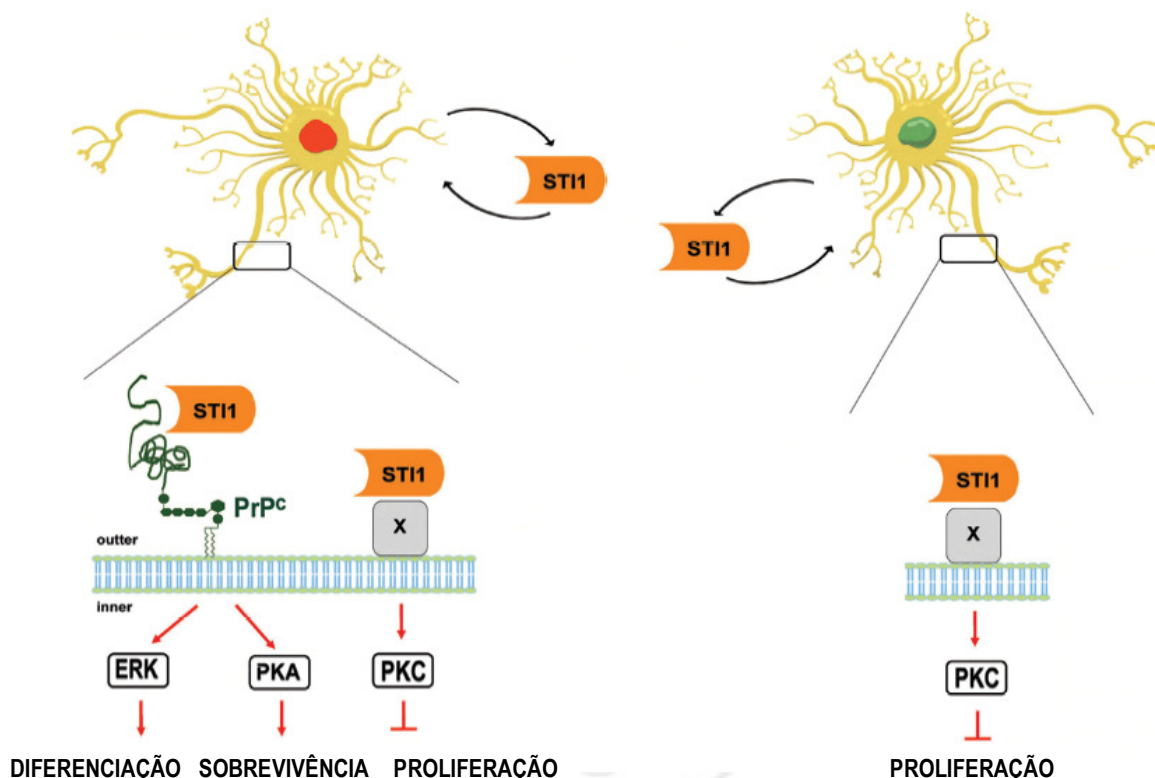


FIGURA 1.4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS INTERAÇÕES FUNCIONAIS DA STI1 EM ASTRÓCITOS E VIAS DE SINALIZAÇÃO.

São mostrados astrócitos com núcleo vermelho (expressando PrPC) e com núcleo verde (não expressando PrPC). PKA (proteína quinase A), PKC (proteína quinase C), ERK (quinase regulada por sinal extracelular), X (receptor desconhecido). As setas indicam indução e as barras horizontais indicam inibição das vias (adaptado de ARANTES *et al.*, 2009).

Os dados obtidos indicam que a STI-1 interage na superfície da célula com PrPC, levando à diferenciação através da ativação da via de sinalização das quinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular (ERK1/2) e à sobrevivência das células através da ativação da via da proteína quinase A (PKA). Na ausência de

PrPC os astrócitos não sofrem alterações morfológicas e são mais suscetíveis à morte celular induzida. A STI1 também é capaz de interagir com outro receptor desconhecido (X), prejudicando o crescimento celular através da ativação da via de sinalização da proteína quinase C (PKC). A interação funcional de PrPc e STI1 parece regular a sobrevivência e diferenciação nos astrócitos, que são processos essenciais para a modulação da atividade neural (ARANTES *et al.*, 2009).

Diversos trabalhos apontam a proteína STI-1 como componente chave de mecanismos envolvidos com resposta ao estresse, via proteína HSP90 associada ao multicomplexo HSP70/HSP90, que levam a modulação e maturação de receptores hormonais, proteínas de sinalização intracelular e reguladores do ciclo celular. Adicionalmente, estudos conduzidos em tecido nervoso de mamíferos indicam que a STI-1 pode se associar a outras proteínas, como a PrPC, na membrana celular e induzir mecanismos de sobrevivência e diferenciação celular. Como exposto anteriormente, a exposição de *T. cruzi* a condições de estresse está relacionada com os processos de diferenciação que ocorrem ao longo do seu ciclo de vida. Tendo em vista a necessidade de aumento do número de estudos sobre componentes de resposta ao estresse neste parasita, torna-se relevante a caracterização da proteína STI-1, uma importante co-chaperona extensivamente estudada em leveduras e mamíferos.

2 OBJETIVOS

Considerando a importância do estresse nutricional para a promoção da diferenciação das formas epimastigotas nas formas tripomastigotas metacíclicas, o estudo de elementos relacionados à resposta ao estresse poderia contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos nesse processo. Dessa forma buscamos nesse trabalho a caracterização da Proteína Induzida pelo Estresse (STI-1) de *Trypanosoma cruzi*, estabelecendo-se como objetivos específicos:

- Avaliar a expressão gênica e os níveis protéicos de STI-1 no parasita sob condições de estresse e em diferentes formas evolutivas;
- Determinar a localização celular da proteína;
- Avaliar possíveis interações da proteína STI-1 com outras proteínas da *T. cruzi*;
- Investigar a participação da proteína STI-1 no início do processo de metaciclogênese.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E MATERIAIS

Os reagentes e materiais utilizados durante a execução deste trabalho foram todos de alto grau de pureza (grau biologia molecular) obtidos de diferentes fornecedores, conforme descrito a seguir:

Ambion: MessageAmp™ II aRNA Kit.

Amicon: Microcon 30.

GE Healthcare: dNTPs; RNase H.

BioRad: Agarose; azul de bromofenol; xilenocianol.

Cult-lab: Soro fetal bovino.

Difco: Extrato de levedura; infuso de fígado; triptose; aminoácidos.

Invitrogen: 1 kb Plus DNA Ladder; DTT; EDTA; fenol; sacarose; Superscript™II; trisma base; Taq DNA polimerase; RNase OUT™.

Merck: Acetato de sódio; ácido acético; ácido bórico; ácido clorídrico; álcool isoamílico; citrato de sódio; cloreto de cálcio; cloreto de lítio; cloreto de magnésio; cloreto de potássio; cloreto de sódio; clorofórmio; etanol absoluto; fosfato de potássio monobásico; fosfato dibásico de sódio; glicose; hidróxido de sódio; maltose; SDS; sulfato de amônia; sulfato de magnésio.

Microbiológica: Hemina.

Promega: DNase RQ1 (livre de atividade tipo RNase); RNasin®; ImProm-IITM Reverse Transcriptase.

Qiagen: QIAquick 96 PCR purification kit; RNeasy®, RNase-free DNase Set, Miniprep Kit.

Sigma: β -mercaptoetanol; ácido L-aspartico; ácido L-glutâmico; ampicilina; brometo de etídeo; BSA; cicloheximida; DEAE-celulose; DEPC; DMSO; DNA de esperma de salmão; ficoll; formaldeído; formamida; heparina; hepes; L-prolina; NP-40; polivinilpirrolidona; RNA sample buffer.

TPP: garrafas para cultivo de células.

USB: Isotiocianato de guanidina; MOPS; sacarose; uréia, soro fetal bovino, L-glutamina, penicilina, estreptomicina, CO₂.

3.2 MEIOS DE CULTURA

A composição dos meios de cultura utilizados neste trabalho está descrita a seguir. O meio de cultura bacteriano foi esterilizado por autoclavação a 1 atm por 20 minutos, diferente dos meios de cultura para parasitas que foram esterilizados por filtração.

Meio LB: Triptona 1 % (p/v); extrato de levedura 0,5 % (p/v); NaCl 1 % (p/v).

Meio LIT (Liver Infusion Tryptose): extrato de levedura 15 g/L; fosfato dibásico de sódio 11,56 g/L; glicose 2,2 g/L; hemina 0,02 g/L; infuso de fígado 5 g/L; KCl 0,4 g/L; NaCl 4,4 g/L; soro fetal bovino 10 % (v/v) e triptose 5 g/L e pH 7,2 ajustado com HCl.

Meio TAU (Triatomine Artificial Urine): CaCl₂ 2 mM; KCl 17 mM; MgCl₂ 2mM; NaCl 190 mM; tampão fosfato pH 6,0 8 mM.

Meio TAU3AAG: TAU suplementado com: ácido L-aspartico 2 mM, ácido L-glutâmico 50 mM, L-prolina 10 mM e glicose 10 mM.

Meio SDM-79: adquirido da empresa LCR.

3.3 SOLUÇÕES E TAMPÕES

As soluções e tampões utilizados neste trabalho foram preparados, conforme composição descrita a seguir, sendo posteriormente filtrados em membrana de poro 0,45 μ .

Clorofórmio/Álcool isoamílico: 24 partes de clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico.

Colchão de sacarose: sacarose 2 M em tampão de lise celular hipotônico.

Fenol saturado: fenol saturado com solução de trisma base 100 mM.

Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico: 25 partes de fenol saturado; 24 partes de clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico.

H₂O: A água ultra pura utilizada em todos os procedimentos foi deionizada e posteriormente filtrada em sistema Elga. A água utilizada para procedimentos com RNA foi tratada com dietil pirocarbonato (DEPC).

Mix de dNTP: dATP, dCTP, dGTP e dTTP foram misturados e diluídos em Tris-HCl pH 7,5 10 mM para obter uma solução estoque com concentração final de 2,5 mM de cada nucleotídeo.

Ponceau S: 0,5% (p/v) de Ponceau S e 1% (v/v) de ácido acético.

Solução de lise para *toothpick*: NaOH 50 mM; Glicerol 5 % (v/v); SDS 0,5 % (p/v); EDTA 5 mM e azul de bromofenol 0,025 %.

Solução de bloqueio para western: 5% (p/v) de leite desnatado em tampão PBS 1x; Tween 0,1%.

Solução de azul de Coomassie para coloração de SDS-PAGE: 0,5% (p/v) de azul de Coomassie R250; 50% (v/v) de metanol e 7,5% (v/v) de ácido acético glacial.

Solução para descoloração de SDS-PAGE: 45% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético glacial.

Solução para neutralização: NaCl 1,5 M; Tris-HCl pH 8,0 0,5 M.

Solução para ressuspensão de polissomos: EDTA 10 mM; NaCl 100 mM; SDS 0,5 % (p/v) e Tris-HCl pH 7,5 10 mM.

Tampão de lise celular hipotônico: β -mercaptoetanol 5 mM; cicloheximida 10 μ g/ml; heparina 20 U/ml; $MgCl_2$ 5 mM; NaCl 10 mM e Tris-HCl pH 7,6 10mM.

Tampão NKM: cicloheximida 10 μ g/ml; heparina 20 U/ml; hepes pH 7,4 10 mM; KCl 5 mM; $MgCl_2$ 1,5 mM e NaCl 140 mM.

Tampão de amostra para DNA: azul de bromofenol 0,25 % (p/v); ficoll 400 25 % (p/v) e xilenocianol 0,25 % (p/v), em tampão TBE 1 X.

Tampão de amostra para SDS-PAGE 4X: 40 mM Tris-HCl pH 6,8; 1% (p/v) SDS; 2,5% (v/v) β -mercaptoetanol; 6% (v/v) glicerol e 0,005% (p/v) azul de bromofenol.

Tampão de eletroforese para SDS-PAGE: Trisma-base 25 mM; glicina 192 mM e SDS 0,1% (p/v).

Tampão de lise protéica: 50 mM Tris-HCl pH 7,6; 0.25 M de sacarose; 0.2% (v/v) Triton X-100 e *Protease inhibitor cocktail* (GE Healthcare) nas concentrações indicadas pelo fabricante.

Tampão de lavagem de sedimento insolúvel: Tris HCl 50 mM; Triton x-100 1%; NaCl 300 mM.

Tampão de ligação: NaCl 300 mM; Imidazol 10 mM; Uréia 8 M; NaH_2PO_4 50 mM.

Tampão de lavagem: NaCl 300 mM; Imidazol 20 mM; Uréia 8 M; NaH_2PO_4 50mM.

Tampão de eluição: NaCl 300 mM; Imidazol 300 mM; Uréia 8 M; NaH_2PO_4 50 mM.

Tampão de Solubilização de proteômica: Urea 7M; Tiourea 2M; DTT 1% (p/v); Triton X – 100 2% (v/v) e *Protease inhibitor cocktail* (GE Healthcare).

Tampão de sonicação: Tris-HCl 50 mM pH8.0 e PMSF 1 mM.

Tampão para revelação por fosfatase alcalina: 100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 5mM MgCl₂.

Tampão de Transferência: 25 mM de Trisma base; 192 mM glicina e 20% (v/v) metanol.

Tampão PBS (10 X): KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; Na₂HPO₄.7H₂O 4,3 mM e NaCl 137 mM.

Tampão PSG: NaCl 150 mM; Tampão salina fosfato pH 8,0; Glicose 10% (p/v).

Tampão RT: KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM e Tris-HCl pH 8,3 250 mM.

Tampão SM: MgSO₄.7H₂O 8 mM; NaCl 100 mM; Tris-HCl pH 7,5 50 mM

Tampão TBE (10 X): ácido bórico 55 g/L; EDTA 8,3 g/L e Trisma base 108 g/L.

Tampão TE: Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM.

Tampão TELT: 50 mM TrisHCl pH 8,0; 62,5 mM EDTA; 2,5 mM LiCl e 4% Triton X-100.

3.4 MICRO-ORGANISMOS E PLASMÍDEOS

Para a realização deste trabalho foram utilizadas células do clone *Dm28c* (isoladas de *Didelphis marsupialis*) de *T. cruzi* (GOLDENBERG *et al.*, 1984; CONTRERAS *et al.*, 1988), e células de *T. brucei* da cepa 29-13 (expressa T7 RNA polimerase e o repressor *tet*).

As linhagens de *Escherichia coli* utilizadas foram a DH5-alfa (Invitrogen) e a BL21(DE3)pLysS (SAMBROOK *et al.*, 1989). Os plasmídeos utilizados estão listados na Tabela 3.1.

TABELA 3.1 – PLASMÍDEOS

Plasmídeo	Características relevantes	Referência
pDNOR201	Vetor de clonagem / canamicina ^R	Invitrogen
pDEST17	Vetor de expressão/ promotor T7/ ampicilina ^R	Invitrogen
pDNOR-STI	Contém a sequência codificadora da STI-1 de <i>T. cruzi</i> clonada no vetor pDNOR201	Este trabalho
pDEST-STI	Contém a sequência codificadora da STI-1 de <i>T. cruzi</i> clonada no vetor pDEST17	Este trabalho
p2T7-177	Vetor contém o promotor da T7 RNA polimerase e operador <i>tet</i> para induzir interferência de RNA em <i>T. brucei</i>	Cedido por Michel Batista
p2T7-177STI	Vetor para induzir interferência de RNA na expressão do gene <i>sti-1</i> em <i>T. brucei</i>	Este trabalho
pTcTAPN	Vetor para expressão de proteínas fusionadas a etiqueta específica, para purificação por TAP-TAG em <i>T. cruzi</i>	Batista, <i>et al.</i> , 2010
pTAP-STI	Contém a sequência codificadora da STI-1 de <i>T. cruzi</i> clonada no vetor pTcTAPN	Este trabalho
pKS-Higro	Vetor para construção de cassete para nocaute gênico em <i>T. cruzi</i> / ampicilina ^R e Higromicina ^R	De Souza, F. S. P., 2009
pKOhigro-STI	Contém o cassete para nocaute gênico do gene <i>sti-1</i> em <i>T. cruzi</i> clonado no vetor pHigro	Este trabalho
pKS-Neo	Vetor para construção de cassete para nocaute gênico em <i>T. cruzi</i> / ampicilina ^R e Neomicina ^R	De Souza, F. S. P., 2009
pKOneo-STI	Contém o cassete para nocaute gênico do gene <i>sti-1</i> em <i>T. cruzi</i> clonado no vetor pNeo	Este trabalho

^R confere resistência ao referido antibiótico

3.5 CULTIVO DE *T. brucei*

Formas procíclicas de *T. brucei* foram cultivadas a 28 °C em meio de cultura SDM-79 (BRUN & SCHONENBERGER, 1979), suplementado com 10% de soro fetal bovino e contendo higromicina (50µg/mL) e G418 (15µg/mL) (WANG *et al.*, 2000; WICKSTEAD *et al.*, 2002). As células foram subcultivadas no mesmo meio a cada 2 dias a fim de manter o crescimento adequado dos parasitas.

3.6 CULTIVO DE *T. cruzi*

Neste trabalho foram utilizados parasitas na forma epimastigota e parasitas em diferentes fases do processo de metaciclogênese *in vitro* (CONTRERAS *et al.*, 1985).

3.6.1 Epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (Epi 3 dias)

Culturas axênicas de *T. cruzi* em meio LIT foram mantidas a 28 °C e, a cada três dias foram inoculadas no mesmo meio de cultura (1×10^6 células/mL) e mantidas nestas condições até a realização dos experimentos. As formas epimastigotas foram obtidas no terceiro dia de cultivo, na fase logarítmica de crescimento, quando a densidade celular era de ~ 2 a 3×10^7 células/mL. Tais condições foram estabelecidas segundo a curva de crescimento do parasita em meio LIT a 28 °C (CAMARGO, 1964).

3.6.2 Epimastigotas submetidos aos diferentes tipos de estresses

Para os testes de resposta do parasita a diferentes tipos de estresse foram utilizadas formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (Epi 3 dias).

3.6.2.1 Epimastigotas submetidos ao estresse nutricional:

As formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (Epi 3 dias) foram coletadas por centrifugação a 8.000 x g, 5 minutos, 10 °C. As condições de estresse nutricional foram proporcionadas pela manutenção destas células por 2 horas, em meio TAU (urina artificial de triatomíneo), na concentração de 5×10^8 células/mL a 28 °C (CONTRERAS *et al.*, 1985).

3.6.2.2 Epimastigotas submetidos ao estresse de pH :

Para o estresse de pH (CAUSTON *et al.*, 2001, modificado para *T. cruzi*) foi adicionada à cultura de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (Epi 3 dias), uma solução de HCl (11,7M) para acidificar o meio até o pH 5,0. A cultura foi incubada a 28 °C por um período de 2 horas.

3.6.2.3 Epimastigotas submetidos ao estresse de temperatura:

As formas epimastigotas, foram mantidas em cultura axênica em meio LIT e incubadas a 28 °C por 3 dias (Epi 3 dias). Após este período de tempo, as células foram submetidas a uma temperatura de 37°C por um período de 2 horas.

3.6.3 Epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (Epi 5 dias)

Culturas axênicas de *T. cruzi* em meio LIT foram mantidas a 28 °C. Neste caso, as formas epimastigotas foram obtidas no quinto dia de cultivo, em final de fase logarítmica de crescimento, quando a densidade celular era de ~ 5 a 6 x 10⁷ células/mL. Tais condições foram estabelecidas segundo a curva de crescimento do parasita em meio LIT a 28 °C (CAMARGO, 1964).

3.6.4 Epimastigotas em diferenciação, durante o processo de metaciclogênese *in vitro* (aderidos ao substrato)

A diferenciação das formas epimastigotas para as formas tripomastigotas metacíclicas foi realizada *in vitro*, sob condições quimicamente definidas (CONTRERAS *et al.*, 1985b; BONALDO *et al.*, 1988). Formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento foram centrifugadas (8.000 x g, 5 minutos, 10 °C) e incubadas por 2 h em meio TAU na concentração de 5 x 10⁸ células/mL, a 28 °C (Epi stress). Após esse estresse nutricional, as células foram transferidos para garrafas de cultivo contendo meio TAU3AAG, na concentração de 5 x 10⁶ células/mL, e incubadas a 28 °C. Nestas condições, as formas epimastigotas aderem às paredes da garrafa e diferenciaram-se nas formas tripomastigotas metacíclicas que apareceram livres no sobrenadante da cultura. Para obtenção das formas em diferenciação (células aderidas às paredes das garrafas – EPI ader), o sobrenadante das culturas foi desprezado e as formas epimastigotas foram liberadas por forte agitação das garrafas de cultura. Foram coletadas amostras em 24 horas de cultivo no meio de diferenciação.

3.6.5 Tripomastigotas metacíclicos (META)

As formas tripomastigotas metacíclicas, foram obtidas pela incubação das formas epimastigotas em fase tardia de crescimento, previamente submetidas ao estresse nutricional em meio TAU (Epi stress), em meio TAU3AAG na concentração de 5×10^6 células/mL, por 96 horas a 28°C. Ao longo desse período, os parasitas em diferenciação se aderem à parede da garrafa e são liberados no meio de cultura como tripomastigotas metacíclicos. Ao final das 96 horas, é possível observar que 80 a 90 % das células neste sobrenadante são tripomastigotas metacíclicas (BONALDO *et al.*, 1988), o que permite purificá-las por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE celulose equilibrada em tampão PSG (DE SOUZA, 1984).

3.7 MÉTODOS GERAIS PARA DNA E RNA

3.7.1 Isolamento de plasmídeos

Culturas da cepa DH5alfa de *E. coli* carreando os plasmídeos de interesse foram incubadas em meio LB a 37 °C sob agitação (200 rpm) por aproximadamente 16 horas. A extração e purificação de plasmídeos foi realizada pelo método de lise alcalina, utilizando o kit Qlaprep Spin Miniprep (Qiagen) seguindo as orientações do fabricante.

3.7.2 Isolamento de DNA genômico de *T. cruzi* e *T. brucei*

O DNA total foi purificado a partir de formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento de *T. cruzi* (Epi 3 dias), ou de formas procíclicas de *T. brucei*, de acordo com o método descrito por Medina-Acosta & Cross (1993). Os

parasitas foram coletados por centrifugação por 1 minuto a 6.000 x *g* e gentilmente lisados em 350 µl de tampão TELT. O DNA foi extraído por 2 vezes com 300 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1) e precipitado com 3 volumes de etanol absoluto. Após centrifugação a 12.000 x *g* por 10 min a 4 °C, o sedimento de DNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µl de tampão TE. Após incubação com RNase A 20µg/mL por 1 hora a 37 °C, a amostra de DNA total foi quantificada por espectrofotometria e armazenada a 4 °C.

3.7.3 Isolamento de RNAm associado a polissomos de *T. cruzi*

Parasitas nas formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (Epi 3 dias) e epimastigotas submetidos ao estresse nutricional, de pH ou de temperatura, provenientes de três réplicas biológicas distintas, foram utilizados para extração de RNAm associado a polissomos, conforme descrito por Goldenberg e colaboradores (1985), com modificações.

Inicialmente, 5 x 10⁸ células foram mantidas em meio de cultura acrescido de 100 µg/mL de cicloheximida durante 10 minutos a temperatura ambiente. A seguir, foram recuperadas por centrifugação a 7.000 x *g* por 10 minutos a 10 °C e lavadas duas vezes em tampão NKM acrescido de cicloheximida (10 µg/ml). O sedimento de células foi congelado em gelo seco e armazenado a -80 °C. A lise dos parasitas foi realizada com 7,9 mL de Tampão de lise celular hipotônico, acrescido de cicloheximida 10 µg/ml, heparina 20 U/ml, β-mercaptoetanol 5 mM e 1% (v/v) de Nonidet P-40, e incubação em banho de gelo por 5 minutos. Decorrido este tempo, foi acrescido 1 % (v/v) de Nonidet P-40 e após breve homogeneização no vortex, a lise celular foi interrompida pela adição de uma solução de sacarose 2 M, acrescida

de cicloheximida 10 µg/ml, heparina 20 U/ml e β-mercaptoetanol 5 mM em um volume apropriado para que a concentração final de sacarose ficasse 0,25 M.

A seguir, os núcleos foram sedimentados por centrifugação a 10.000 x g, 10 minutos, a 4 °C e as mitocôndrias fragmentadas por centrifugação a 10.000 x g, 30 minutos, a 4 °C. A fração polissomal foi obtida após ultra-centrifugação do sobrenadante pós-mitocondrial, sobre um colchão de sacarose 2 M (acrescido de cicloheximida 10 µg/ml, heparina 20 U/ml e β-mercaptoetanol 5 mM), a 39.000 rpm por 2 horas a 4 °C em ultra centrífuga Beckman usando rotor SW40

. O sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo as moléculas de RNA associadas a polissomos foi armazenado a -80 °C. Os sedimentos de RNAm polissomal foram posteriormente purificados utilizando-se o kit RNeasy (Qiagen), conforme o protocolo “*Animal Cells I*”, seguindo as especificações do fabricante, com o passo adicional de tratamento com DNase na própria coluna (“*RNase-free DNase set*”).

3.7.4 Determinação da quantidade e qualidade dos ácidos nucleicos

A quantidade de DNA e RNA nas amostras foi determinada por espectrofotometria, pela da medição da absorbância a 260 nm, considerando que o valor da absorbância igual a 1 equivale a 40 µg/ml de RNA e a 50 µg/ml de DNA. A qualidade das amostras foi determinada através da razão entre a absorbância a 260 e a 280 nm.

3.7.5 Eletroforese de DNA

A separação de moléculas de DNA por eletroforese foi realizada segundo descrito em Sambrook (1989), utilizando géis de agarose com concentração entre

0,8 a 1,4% (p/v), ou géis de poliacrilamida com concentração de 5% (p/v). As corridas eletroforéticas foram feitas a 80 V em tampão TBE 1X. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta (312 nm), após tratamento do gel por 20 minutos em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/ml), e as imagens obtidas foram digitalizadas e/ou impressas em papel térmico.

3.7.6 Amplificação de DNA por PCR

A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho foi determinada com o auxílio do programa *Primer Select* (*DNA Star, Laser Gene*), baseando-se nas informações do genoma de *T. cruzi* e *T. brucei* disponíveis na base de dados GeneDB (www.genedb.org). Após vários testes para determinar os melhores parâmetros para a obtenção de produtos específicos, as condições de amplificação para cada gene foram estabelecidas. Antes da clonagem, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose e quantificadas por espectrofotometria.

O gene *sti-1* de *T. cruzi* (*Tcsti-1/* Tc00.1047053506321.290) foi amplificado por PCR para clonagem em vetores de expressão, bem como parte do gene *sti-1* de *T. brucei* (*Tbsti-1/* Tb927.5.2940), para clonagem em vetor para produzir interferência de RNA (RNAi). A PCR também foi utilizada para isolar fragmentos de DNA correspondentes às regiões intergênicas a montante e a jusante do gene *sti-1* no genoma de *T. cruzi*, as quais foram empregadas na construção dos cassetes de DNA para inativação deste gene em *T. cruzi* (nockout gênico). Além disso, a PCR também foi usada para verificar a inserção do cassete knockout na região correta do DNA genômico de *T. cruzi* transfectado. A metodologia empregada em cada um desses casos está descrita nos itens a seguir.

3.7.7 Clonagem do gene *sti-1* de *T. cruzi*

O gene *Tcsti-1* foi isolado através de amplificação por PCR, realizada em um volume final de 50 µL contendo 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi*, 200 µM de cada dNTP, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (MK07-F 5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGACGCAACAGAACTTAGAACAG3' e MK07-R 5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTTCCAAAACGAATGATTCCAGC3'), 2,5 U da enzima *Pfu* DNA polimerase e tampão para *Pfu* DNA polimerase (Stratagene). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: 94°C por 5 min, 10 ciclos a 94 °C por 30 s, 62 °C por 30 s, e 72 °C por 2 min, seguido de 25 ciclos a 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s, e 72 °C por 2 min, com uma etapa final de extensão a 72 °C por 4 min. O produto de PCR foi purificado pela precipitação com PEG (PEG 8000 30 %; MgCl₂ 30 mM). Ao volume de reação foram adicionados 150 µL de tampão TE e 50 µL de PEG. Após homogeneização e centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi ressuspenso em 10 µL de tampão TE.

Para a clonagem do gene *Tcsti-1* foi utilizado o sistema Gateway® (Invitrogen), cuja tecnologia se baseia na recombinação de DNA utilizando sequências específicas do bacteriófago lambda. Fragmentos de DNA contendo nas suas extremidades sítios específicos *attB* são inseridos de modo rápido e eficiente em vetores de entrada contendo sítios específicos *attP*, através de uma reação de recombinação entre estes sítios, dando origem aos sítios *attL* no vetor contendo o inserto e *attR* no fragmento trocado, conforme pode ser observado na figura 3.1. Posteriormente pode ser efetuada de modo rápido a passagem do inserto para

vetores de destino, de variados tipos e características, através de outra reação de recombinação.

O produto de amplificação contendo o gene *Tcsti-1* flanqueado pelos sítios *attB* foi inserido no vetor pDONR221 seguindo as orientações do fabricante (*Gateway Technology* - Invitrogen), originando o plasmídeo pDONR-STI. Para realizar a expressão do gene *Tcsti-1* em *E. coli*, foi efetuada uma outra reação de recombinação entre os plasmídeos pDONR-STI e pDEST17, dando origem ao plasmídeo pDEST-STI, o qual possui as características necessárias para a produção heteróloga da proteína fusionada a uma sequência de seis histidinas na porção amino-terminal.

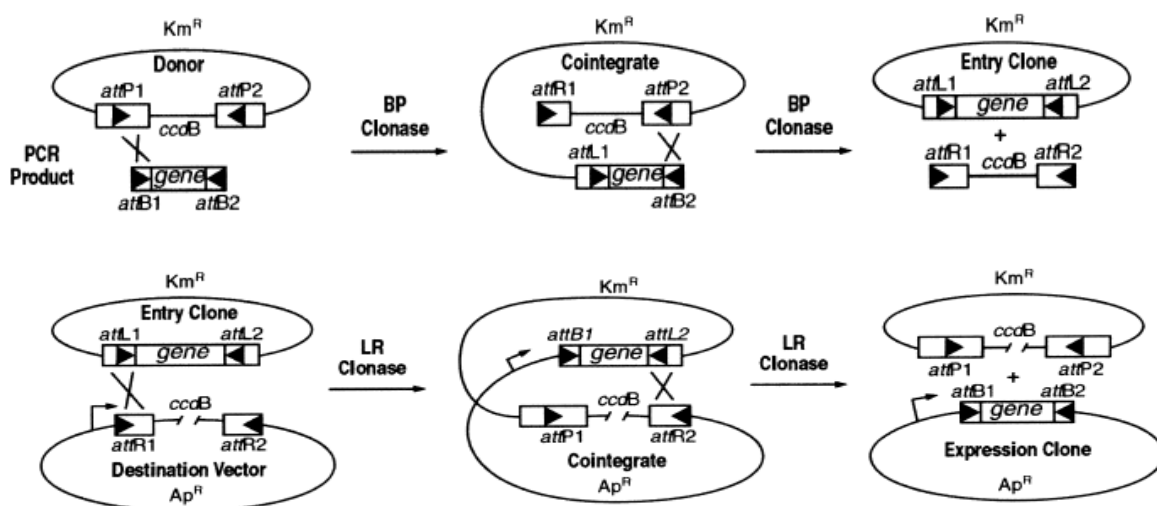


FIGURA 3.1 – ESQUEMA DE CLONAGEM POR RECOMBINAÇÃO USANDO SISTEMA GATEWAY (adaptado do Manual Gateway® Technology – Invitrogen)

Acima é mostrada a reação de recombinação do produto de PCR com o vetor de entrada (pDONR) e abaixo, a transferência do inserto para o vetor de destino (pDEST) através de uma segunda reação de recombinação.

3.7.8 Transformação bacteriana e seleção de clones recombinantes

Nas transformações foram utilizados 50 µL de bactérias *E. coli* cepa DH5alfa cálcio- competentes, preparadas como descrito em Sambrook *et al.* (1989), e 2 µL de reação de ligação. Após incubação em banho de gelo por 30 minutos, foi realizado o choque térmico por 2 minutos a 42 °C seguido de incubação em banho de gelo por 2 minutos. As células foram semeadas em meio LB solidificado contendo o antibiótico específico para seleção (ampicilina 100µg/mL ou canamicina 25µg/mL) e incubadas a 37 °C por 16 horas. A seleção de clones foi feita a partir da coleta de colônias com o auxílio de palitos de dente esterilizados (*toothpick*) e incubação das células em solução de lise para *toothpick* a 65 °C por 10 minutos. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose e os clones recombinantes foram posteriormente confirmados após isolamento dos plasmídeos e reação de PCR.

3.7.9 Sequenciamento de DNA

Todos os fragmentos de DNA clonados foram sequenciados através do método de Sanger pela empresa Macrogen (Coréia do Sul).

3.7.10 Análises de Bioinformática

As sequências de DNA foram analisadas utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997, disponível na página do NCBI em <http://www.ncbi.nih.gov>) e também os programas EditSeq e SeqMan do pacote de análise Lasergene (Dnastar Inc.).

As sequências de proteínas foram analisadas utilizando os algoritmos BLAST e ClustalW (Larkin, *et al.*, 2007). As buscas por domínios conservados na

proteína foram realizadas no banco de dados de famílias de proteínas (Pfam, <http://pfam.sanger.ac.uk>, FINN *et al.*, 2008).

3.8 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

A fim de verificar o nível de expressão do gene *sti-1* de *T. cruzi* foi realizada a técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Os experimentos foram realizados com as amostras de RNAm associado a polissomos obtidos de parasitas nas formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (Epi 3 dias), bem como de epimastigotas submetidos a cada um dos três tipos diferentes de estresse (nutricional, de pH ou de temperatura), provenientes de três réplicas biológicas distintas (conforme descrito no item 3.7.3).

3.8.1 Obtenção de DNA complementar a partir do RNAm polissomal

O protocolo utilizado foi baseado no manual técnico da Promega (ImProm-II™ Reverse Transcription System), assim como, os reagentes utilizados para essa reação. O RNA do parasita foi empregado como molde para a síntese de cDNA via transcriptase reversa. Aproximadamente 0,5 µg de RNA foi incubado com oligo(dT)₁₅, por 10 min a 70 °C para desnaturação de ambos e imediatamente transferidos para o gelo. À mistura foi adicionada uma solução de dNTPs (0,5 mM/µL), MgCl₂ (120 µM), RNaseOUT (2 unidades) (Invitrogen), transcriptase reversa ImProm-II (Promega) e respectivo tampão. A reação ocorreu por 2 h a 42 °C. As amostras de cDNA foram purificadas por Microcon YM-30 (Millipore), conforme descrição do fabricante, e armazenadas a -20 °C.

3.8.2 Amplificação dos genes selecionados

O princípio da técnica de PCR em tempo real baseia-se na quantificação das cadeias de DNA geradas durante a reação, a partir da detecção de fluorescência emitida por um fluorocromo que se intercala ao DNA dupla fita. Neste trabalho foi utilizado o fluorocromo *SybrGreen I* (*Applied Biosystems*), que é capaz de se intercalar a qualquer molécula de DNA dupla fita produzida durante a reação de PCR. Devido à ligação inespecífica do corante ao DNA, ao final de cada reação de PCR foi determinada uma curva de dissociação para verificar a formação de um único produto de amplificação, uma vez que produtos de amplificação de tamanhos diferentes dissociam do corante em temperaturas distintas.

Nas reações foram usados 3 conjuntos diferentes de iniciadores, um conjunto complementar ao gene *sti-1* de *T. cruzi*, e outros dois, complementares aos genes codificadores da histona H2B e da proteína ribossomal L9 de *T. cruzi*, usados para normalização dos dados. As sequências dos iniciadores e suas respectivas temperaturas de fusão estão listadas na tabela 3.2.

TABELA 3.2 – LISTA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES USADOS NA PCR QUANTITATIVA

GENE	SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS*	Tm**(°C)
Sti-1	TcSTI-1qPCR-F: GAAGGACGCATGCGGACTCTG	60
	TcSTI-1qPCR-R: GCGCGTTTTGCCACTTCATCTC	
H2B	TcH2B-F: CGGTGGTGCGCGTCAACAAGAAGC	60
	TcH2B-R: CCAGGTCCGCCGGCAGCACGAG	
L9	TcL9-F: CCTTCACTGCCGTTGTTGGTTTG	70
	TcL9-R: ATGCGAGAGTGCCGTGTTGATGGT	

* As sequências estão apresentadas na direção 5' → 3'

** Temperatura de anelamento dos iniciadores

O método de quantificação utilizado foi o de curva padrão, baseado nos valores de C_T (*threshold cycle*) obtidos para cada amostra. A curva padrão consistiu de 5 pontos, com massa de cDNA variando de 50 ng a 80 pg, obtidas a partir de diluição seriada de 1:5 para cada gene.

As reações foram realizadas no ABI PRISM 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) num volume final de 20 μ L, utilizando 10 ng de cDNA para cada reação, 250 mM de cada iniciador e a concentração recomendada de *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems). As amplificações foram realizadas em triplicata com um passo inicial de desnaturação de 10 minutos a 95 °C, seguido por 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos, temperatura de anelamento do iniciador (em °C) por 30 segundos (ver Tabela 3.2) e 72 °C por 60 segundos. Para confirmar a amplificação de fragmentos de DNA específicos, foram realizadas análises de curva de dissociação e eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% para cada reação.

3.8.3 Análise dos resultados da qPCR

As quantidades relativas de RNAm do gene *Tcsti-1* obtidas foram normalizadas contra as quantidades obtidas para os genes controles H2B e L9. Os níveis de RNAm polissomal para cada condição de estresse foram determinados usando como referência as quantidades de RNAm polissomal obtidas para as formas epimastigotas em crescimento exponencial (Epi 3 dias). A análise estatística dos dados foi feita através da Análise de Variância (ANOVA) de fator único, usando o programa Stratgraphics plus 5.0.

3.9 MÉTODOS GERAIS PARA PROTEÍNAS

3.9.1 Preparação de extratos protéicos de *T. cruzi* e *T. brucei*

O conteúdo protéico total foi extraído de formas procíclicas de *T. brucei* portando o plasmídeo de interferência p2T7-177, e de *T. cruzi* com gene sti-1 inativado (nocaute), de *T. cruzi* selvagem nas formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, epimastigotas submetidos ao estresse nutricional, de pH ou de temperatura, epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento, epimastigotas em diferenciação e tripomastigotas metacíclicos. As células foram coletadas e centrifugadas a 7.000 x g por 5 minutos a 4 °C e lavadas três vezes em tampão PBS 1X nas mesmas condições. O sedimento de células foi ressuspensão em 75 µL de tampão PBS 1X e 25 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE 4X. Após aquecimento a 95 °C por 5 minutos, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes contendo os extratos protéicos de 1×10^5 células/ µL de *T. brucei* e de 2 a 20×10^5 células / µL de *T. cruzi* foram coletados e armazenados a -80 °C até o momento do uso. Os extratos protéicos foram quantificados utilizando o kit 2D-Quant (Amersham), seguindo as orientações do fabricante.

3.9.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante

Amostras protéicas foram previamente misturadas com tampão de amostra para SDS-PAGE e aquecidas a 95 °C por 5 minutos. A eletroforese foi realizada sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida a 10%, conforme descrito por Laemmli (1970). Os géis foram corados com solução de azul de Coomassie e descorados com solução de descoloração de SDS-PAGE. Os géis contendo as

amostras dos experimentos de Imunoprecipitação foram corados com nitrato de prata, segundo o método de Blum e colaboradores (1987).

3.9.3 Produção da proteína STI-1 recombinante de *T. cruzi* em sistema bacteriano

Bactérias *E. coli* cepa BL21(DE3)*pLysS* foram transformadas por choque térmico com plasmídeo de expressão pDEST-STI contendo o gene selecionado. A indução da expressão do gene e a produção da proteína TcSTI-1 recombinante foi feita pela adição de IPTG na cultura bacteriana em fase logarítmica de crescimento (DO_{600nm} entre 0,6 e 0,8). O IPTG (Isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo) é usado na indução da expressão de genes que estão sob controle do promotor *lac*, como ocorre no plasmídeo pDEST17. Testes de expressão foram realizados em pequena escala para avaliar os parâmetros mais adequados para a produção da proteína recombinante. Uma vez estabelecidas as condições mais adequadas para a expressão, as células foram cultivadas em 250 mL de meio LB contendo cloranfenicol (25 μ g/mL) e ampicilina (100 μ g/mL) sob agitação (200 rpm) a 37 °C. Quando a cultura atingiu a fase logarítmica de crescimento, foi coletada uma alíquota de 5 mL (fração não induzida) antes da adição de 0,1 mM de IPTG. As células foram cultivadas por mais 3 horas nas mesmas condições. Após o período de indução, as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g por 10 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas em tampão de sonicação e lisadas por ultrassom (Ultrasonic homogenizer, Cole-Parmer) em banho de gelo com 4 ciclos de 10 segundos em potência 8. Uma alíquota de 100 μ L do lisado foi coletada (fração de proteínas totais) e o restante foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante (fração de proteínas solúveis) foi coletado e armazenado a -20 °C.

O sedimento foi lavado com tampão de lavagem de sedimento insolúvel por 3 vezes nas mesmas condições, antes de ser ressuspenso em tampão de ligação e sonificado como descrito anteriormente. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20 °C (fração de proteínas insolúveis). As alíquotas de todas as frações coletadas (não induzida, proteínas totais, solúveis e insolúveis) foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE.

3.9.4 Purificação da proteína STI-1 recombinante de *T. cruzi*

A purificação da proteína recombinante foi realizada em duas etapas: a primeira por cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel e a segunda por gel preparativo. A proteína expressa a partir do vetor de expressão pDEST17 apresenta uma fusão a 6 resíduos de histidina (cauda-His) na porção amino-terminal. Essa cauda de histidinas apresenta carga negativa quando em tampão alcalino, o que facilita sua interação com a resina contendo íons níquel com carga positiva. Após lavagens, a proteína recombinante foi eluída da resina com tampão contendo imidazol, um análogo da histidina que compete pela ligação com a resina, liberando a proteína.

A coluna cromatográfica foi empacotada utilizando-se 1 mL da suspensão de resina Ni-NTA Agarose (Qiagen) e lavada com 10 vezes o volume da coluna utilizando tampão de ligação. Uma vez equilibrada a coluna, foi adicionada a fração de proteínas solúveis e a suspensão foi incubada a 4 °C por 16 horas em agitador orbital. Decorrido o período, a fração correspondente às proteínas que não se ligaram à resina foi coletada (fração não ligada – NL). A resina foi lavada com 10 vezes o volume da coluna com tampão de lavagem e alíquotas da primeira e a última fração da lavagem (L1 e L2) foram coletadas. As proteínas ligadas à resina

foram eluídas com 500 μ L de tampão de eluição. Repetiu-se duas vezes esta etapa, coletando as alíquotas eluídas em tubos diferentes (frações eluídas E1, E2, e E3). Todas as frações foram armazenadas a -20°C para posterior análise em SDS-PAGE.

A segunda etapa da purificação foi feita pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) preparativo (20x20cm). A fração eluída por cromatografia de afinidade misturada ao tampão de amostra para SDS-PAGE, foi aplicada em gel de acrilamida 10% e submetida à eletroforese a 15 mA por 16 horas, até que a banda correspondente ao azul de bromofenol tivesse atingido o final do gel. Após esse período, o gel foi corado com solução de KCl 100 mM gelada e a banda correspondente foi cortada e transferida para uma membrana de diálise contendo 1 mL de tampão de eletroforese para SDS-PAGE. As extremidades da membrana foram fechadas com grampos e eletroeluição foi realizada a 50 mA por duas horas. Coletou-se o tampão do interior da membrana e verificou-se a pureza da proteína STI-1 por SDS-PAGE não preparativo. A concentração de proteína purificada foi determinada usando o kit *QUANT-iT Protein Assay* (Invitrogen), segundo orientações do fabricante.

3.9.5 Produção de antissoro policlonal

Dois camundongos da linhagem Swiss foram imunizados através de injeções intraperitoniais utilizando 50 μ g da proteína recombinante purificada emulsificada com adjuvante de Freund incompleto (Sigma) na primeira inoculação. Nas quatro imunizações seguintes, realizadas a cada 2 semanas, foram administrados 50 μ g da proteína recombinante misturados a uma suspensão de Alu-Gel-S (Serva). Sete dias após a última inoculação, o sangue foi coletado por punção cardíaca dos

animais, previamente sedados com 0,2 mg de cetamina e 2 mg de xilasina. Após incubação do sangue a 37 °C por 5 minutos e centrifugação a 1.500 x g por 10 minutos, os soros foram coletados, aliquotados e armazenados a -20 °C. Os testes realizados por *Western blot* mostraram que o antissoro obtido reage especificamente com a proteína TcSTi-1 recombinante e reconhece uma banda específica com massa molecular compatível com a proteína STI-1 nos extratos totais dos parasitas. Não foi observada reação cruzada com o soro pré-imune, mesmo na diluição de 1:200.

Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com manual estabelecido pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da FIOCRUZ, resolução 242/99, e aprovados conforme protocolo P-0434/07.

3.9.6 Análise de expressão de proteínas por *Western blotting*

Esse procedimento foi realizado conforme descrito por Towbin e colaboradores (1979). Extratos protéicos foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) e as proteínas foram subsequentemente transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Biosciences). As membranas foram incubadas em solução de bloqueio durante 16 horas a 4 °C antes da incubação com os antissoros e a revelação pela reação com fosfatase alcalina ou por quimioluminescência.

Antes da revelação por fosfatase alcalina, as membranas foram incubadas por 2 h a 37 °C com o antissoro policlonal produzido em camundongo contra a proteína recombinante TcSTI-1 (diluição 1:400 em PBS 1X). Após três lavagens em PBS 1X, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente por 45 min com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina

(Sigma) diluído 1:10.000 em PBS 1X. A membrana foi então lavada três vezes em PBS 1X antes da incubação em tampão para revelação por fosfatase alcalina, e os anticorpos ligados foram visualizados pela reação da fosfatase alcalina utilizando como substratos o BCIP (50 µg/ml) e o NBT (50 µg/ml) (Promega). Para algumas membranas foi realizada uma incubação adicional de uma hora a 37 °C antes do anticorpo secundário, utilizando antissoro contra a GAPDH de *T. cruzi* diluído 1:600 em PBS 1X.

As membranas que foram reveladas por quimioluminescência foram incubadas por 2 h a 37 °C com o antissoro contra a proteína recombinante TcSTI-1 diluído 1:800 em PBS 1X, ou com antissoro policlonal produzido em coelho contra a proteína HSP70 citossólica de *T. cruzi* diluído 1:5.000 em PBS 1X (cedido gentilmente pela Dra. Silvane Murta – Fiocruz MG). Após cinco lavagens em PBS 1X, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente por 45 min com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho conjugados à peroxidase (Amersham Biosciences) diluídos 1:7.500 em PBS 1X. As membranas foram lavadas cinco vezes em PBS 1X e os complexos proteína-anticorpo foram detectados utilizando o kit ECL *Western blotting system* (Amersham Biosciences), segundo as orientações do fabricante. Para algumas membranas foi realizada uma incubação adicional de uma hora a 37 °C antes do anticorpo secundário, utilizando antissoro contra a GAPDH de *T. cruzi* diluído 1:800 em PBS 1X.

A densidade das bandas foi quantificada pelo programa ImageJ (disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) e normalizada contra a média dos valores obtidos para a proteína TcGAPDH usada como controle. A análise estatística dos dados foi feita através da Análise de Variância (ANOVA) de fator único.

3.10 ENSAIOS DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA

Foram utilizadas duas metodologias distintas para a análise dos complexos protéicos formados com a proteína TcSTI-1. Para ambas, foram realizados vários testes para se determinar os melhores parâmetros para as incubações, lavagens e eluições dos complexos protéicos formados.

3.10.1 Co-Imunoprecipitação das proteínas TcSTI-1 e TcHSP70

Antissoros contra as proteínas TcSTI-1 (8 μ L) e TcHSP70 (2 μ L) foram incubados por 2 horas a 4 °C com cerca de 50 μ L de resina Sepharose-proteína G ou de resina Sepharose-proteína A (Sigma), respectivamente. Antissoros anti-IgG de camundongo e pré-imune de coelho foram usados como controle da especificidade da imunoprecipitação. Decorrido o período de incubação, as resinas foram bloqueadas com uma solução de 1 mg/mL de BSA em PBS 1X. Os anticorpos foram ligados covalentemente às resinas pelo tratamento com uma solução de dimetil-pimedilato (6,5 mg/mL) e trietanolamina (200 mM) em PBS 1X por 30 minutos a temperatura ambiente, seguida por uma etapa de lavagem com uma solução de trietanolamina (200 mM) em PBS 1X. Essas etapas de incubação e lavagem foram repetidas mais duas vezes. A ligação dos anticorpos às resinas foi parada pela incubação com uma solução de etanolamina (50 mM) em PBS 1X, e os anticorpos que não se ligaram foram removidos por uma etapa de lavagem com 200 mM de glicina (pH 2.5). As resinas estavam prontas para uso depois da neutralização do pH, através de lavagens com PBS 1X.

Os extratos protéicos foram preparados a partir de formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase logarítmica de crescimento (Epi 3 dias), provenientes de 3 réplicas biológicas distintas. Para isso, 10^9 células foram lisadas com 1 mL tampão

hipotônico (100 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 10 mM Hepes pH 7,0; 0,5% NP-40; 1 mM PMSF; 1 μM E-64) e incubação por 2 horas a 4 °C sob agitação. A fração solúvel do extrato protéico foi obtida após centrifugação a 7.000 x g por 20 minutos a 4 °C. Foi incubado 1 mL de extrato com cada 50 μL de resina, previamente conjugadas aos anticorpos específicos (anti-TcSTI-1 ou anti-TcHSP70) ou ao anticorpos controle. Depois de 16 horas de incubação a 4 °C sob agitação, as resinas foram lavadas três vezes com 10 volumes do tampão de lavagem (100 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 10 mM Hepes pH 7,0; 1% NP-40; 1 mM PMSF; 1 μM E-64). As proteínas ligadas às resinas foram eluídas com um volume de 200mM de glicina (pH 2,5) e inibidores de proteases e em seguida o pH das amostras foi ajustado para 7,0 – 8,0. A análise das amostras foi realizada por eletroforese em SDS-PAGE e *Western blotting*.

3.10.2 Imunoprecipitação de complexos protéicos associados à proteína TcSTI-1 para identificação por espectrometria de massa

Esse experimento foi realizado de modo semelhante ao descrito no item anterior, com as seguintes modificações. Foram utilizados o antissoro específico contra a proteína TcSTI-1 (6 μL) e como controle (6 μL), soros provenientes de dois camundongos não imunizados, os quais foram previamente testados por *Western blotting* e não apresentaram reatividade contra proteínas de extratos obtidos de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os anticorpos foram ligados covalentemente a cerca de 100 μL de resina Sepharose-proteína G, como descrito anteriormente, com uma modificação na etapa de bloqueio. Depois de todo o processo de ligação covalente anticorpo-resina e da neutralização do pH, a resina foi incubada com leite

10% em PBS 1X por 2 horas a temperatura ambiente e sob agitação. Após o bloqueio, a resina estava pronta para uso depois de 3 lavagens com PBS 1X.

Neste experimento os extratos protéicos foram preparados a partir de formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento (Epi 3 dias) e também de formas epimastigotas em fase tardia de crescimento, submetidas a 2 horas de estresse nutricional em meio TAU (Epi stress). Três réplicas biológicas distintas foram usadas no preparo dos extratos de cada uma das formas. Um mililitro de extrato protéico, proveniente de 10^9 parasitas, foi incubado com cada 100 μ L de resina, previamente conjugadas ao soro controle ou ao antissoro específico contra a TcSTI-1. Decorrido o período de incubação, as resinas foram lavadas 5 vezes com 10 volumes de tampão hipotônico (100 mM KCl; 5 mM $MgCl_2$; 10 mM Hepes pH 7,0; 0,5% NP-40; 1 mM PMSF; 1 μ M E-64) acrescido de 50mM de NaCl. A eluição foi realizada como descrito anteriormente e as amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento da análise por espectrometria de massa (LC/MS/MS). O processo de imunoprecipitação foi realizado em duplicata, para cada resina (controle e antissoro específico) de cada réplica biológica, totalizando 12 amostras.

3.11 INATIVAÇÃO DO GENE *Tcsti-1* ATRAVÉS DE NOCAUTE GÊNICO EM *T. cruzi*

Um dos experimentos clássicos utilizados na caracterização de uma determinada proteína através de genética reversa é a inativação do gene por nocaute (*knock-out*). Através desta metodologia o gene codificador da proteína de interesse presente no DNA genômico é substituído total ou parcialmente por um

segmento de DNA construído *in vitro*. Esta troca leva a deleção total ou parcial do gene e consequentemente a sua inativação. Depois da seleção dos clones mutantes, o fenótipo celular devido à ausência de expressão da proteína de interesse pode ser investigado e a sua participação em diversos processos celulares pode ser inferida. Para o nocaute do gene *Tcsti-1* foram construídos dois cassetes de DNA para inativação total do gene em *T. cruzi*, conforme descrito a seguir.

3.11.1 Amplificação das regiões intergênicas a montante e a jusante do gene *sti-1* de *T. cruzi* para construção dos cassetes para nocaute

Para amplificação das regiões intergênicas foram usados 300 µL de volume final contendo 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi*, 200 µM de cada dNTP, 2,5mM de MgCl₂, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (descritos na tabela 3.3), 6 U da enzima Taq DNA polimerase e tampão específico para a enzima (Invitrogen). As condições da reação de PCR foram as seguintes: 94°C por 4 min, 30 ciclos a 94°C por 30 s, temperatura de anelamento específica (T_m) por 30 s, e 72°C por 30 s, com uma etapa final de extensão a 72°C por 4 min. A purificação dos produtos de PCR foi efetuada por precipitação com acetato de sódio 0,3 M e 2 volumes de etanol absoluto a -20 °C por 16 horas. Decorrido o tempo, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos e o DNA precipitado foi dissolvido em 20 µL de água ultrapura.

TABELA 3.3 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA NOCAUTE DE *Tcsti-1*

DESCRIÇÃO	SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS*	Tm**(°C)
Iniciadores para isolar região intergênica a montante do gene	MKSTIUPS-F: GTAGGAT <u>TTCTAG</u> AATTCAAGCGCCATCAGAGGAAGG MKSTIUPS-R: TTGCGT <u>CTAG</u> AAATCCTATAGTAGCCTAGATCAAAAACACC MKSTI-UPSNEOF: TAGGATGTCGACATTCAAGCGCCATCAGAGGAAG MKSTI-UPSNEOR: TTGCGAAGCTTAATCCTATAGTAGCCTAGATCAAAAACACC	62
Iniciadores para isolar região intergênica a jusante do gene	MKSTIDOWN-F: AAGAGGGATCCTAAACAGGCTATGATAAGGTGAAATAAATGG MKSTIDOWN-R: CCGCAATGCGGATCCAATTAGCTAAAAAAAGGGAAAAAGGT MKSTI-DOWNNEOF: GTAAGAGGGAATTCAAACAGGCTATGATAAGGTGAAATAAATGG MKSTI-DOWNNEOR: CCGCAATGCGGATCCAATTAGCTAAAAAAAGGGAAAAAGGT	56

* As sequências estão apresentadas na direção 5' → 3'

** Temperatura de anelamento dos iniciadores

Os sítios de restrição para endonucleases estão sublinhados: sítio para *Xba*I inserido nos iniciadores MKSTIUPS-F e R, sítio *Bam*HI inserido nos iniciadores MKSTIDOWN-F e R e MKSTI-DOWNNEOR, sítio *Sal*I no iniciador MKSTI-UPSNEOF, sítio *Hind*III no iniciador MKSTI-UPSNEOR, sítio *Eco*RI no iniciador MKSTI-DOWNNEOF.

3.11.2 Clonagem das regiões intergênicas do gene *sti-1* de *T. cruzi* para construção dos cassetes para nocaute

Na construção dos cassetes de DNA utilizados para o nocaute do gene *Tcsti-1* foram utilizadas enzimas de restrição e modificadoras de DNA, segundo as orientações dos fornecedores (Invitrogen, New England Biolabs, Promega).

A estratégia usada para produzir os cassetes para o nocaute do gene *Tcsti-1* foi amplificar regiões a montante e a jusante do gene com um conjunto distinto de

iniciadores, para permitir a clonagem no vetor pBluescript II KS (Stratagene, EUA) contendo o gene que confere resistência à higromicina (*hyg*) ou o gene que confere resistência à neomicina (*neo*), originando dois cassetes distintos para o nocaute dos dois alelos do gene como esquematizado na figura 3.2.

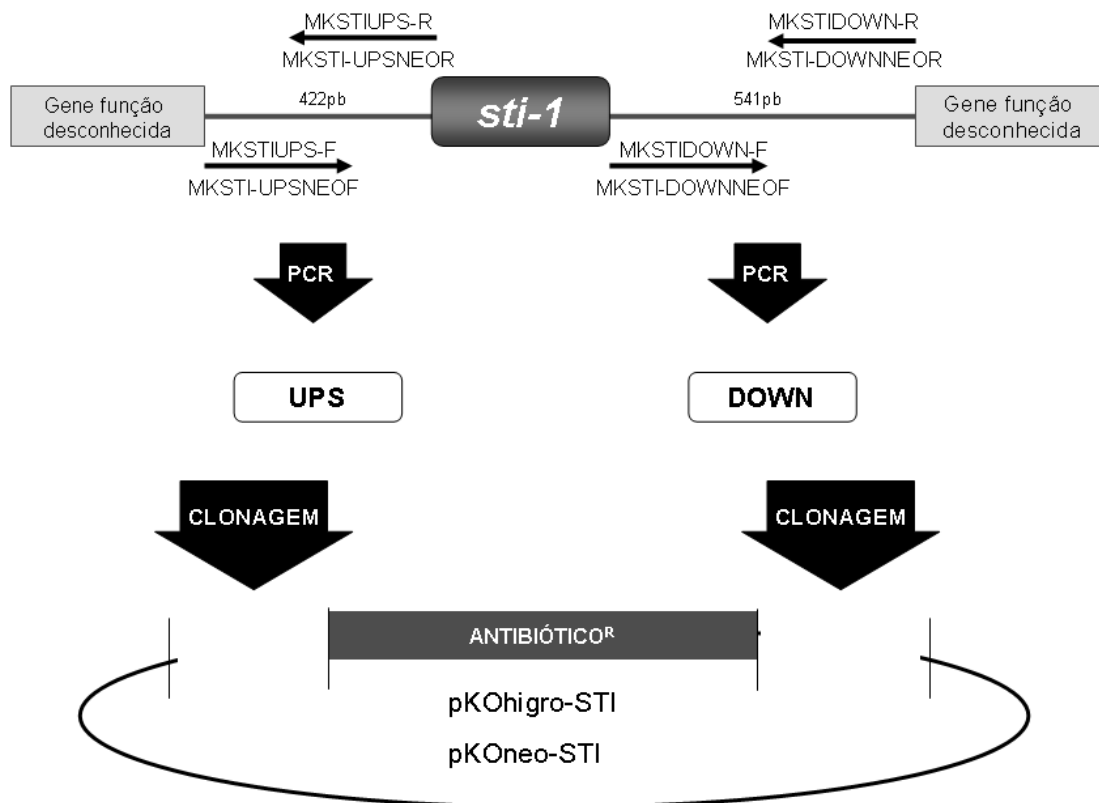


FIGURA 3.2 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DA AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DAS REGIÕES INTERGÊNICAS DE *Tcsti-1*

Acima é mostrado um esquema das regiões a montante e a jusante do gene *sti-1* em *T. cruzi* e o local de anelamento dos iniciadores usados no isolamento dessas regiões por PCR. Abaixo é ilustrado o processo de clonagem dessas regiões (UPS e DOWN) em vetores contendo genes de resistência *hyg* ou *neo*, gerando respectivamente os plasmídeos pKOhigro-STI ou pKOneo-STI.

O fragmento de DNA correspondente a região a montante do gene *Tcsti-1* (UPS) foi digerido com a enzima *XbaI* quando clonado a montante do gene *hyg*, e digerido com *SalI* e *HindIII* quando clonado a montante do gene *neo*. O fragmento de

DNA correspondente a região a jusante do gene *Tcsti-1* (DOWN) foi digerido com a enzima *Bam*HI quando clonado a jusante do gene *hyg*, e digerido com *Eco*RI e *Bam*HI quando clonado a jusante do gene *neo*, originando os plasmídeos pKOhigro-STI e pKOneo-STI. Estes plasmídeos foram usados para amplificação e purificação dos cassetes para nocaute gênico.

3.11.3 Amplificação e purificação dos cassetes para nocaute usados na transfecção dos parasitas

Os dois plasmídeos recombinantes gerados após clonagem das regiões intergênicas (pKOhigro-STI e pKOneo-STI) foram usados para amplificação dos cassetes para nocaute usando os iniciadores MKSTIUPS-F e MKSTIDOWN-R para o cassete higromicina, e os iniciadores MKSTI-UPSNEOF e MKSTI-DOWNNEOR para o cassete neomicina, mostrados na tabela 3.3.

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 100 ng do plasmídeo, 10 pmol dos respectivos oligonucleotídeos iniciadores, 200 µM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 40 U da enzima Taq DNA polimerase e tampão específico para a enzima (Invitrogen) em um volume final de 2000 µL. O programa usado para amplificação foi: desnaturação por 4 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização dos oligonucleotídeos a 56 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 2 min, com uma etapa final de extensão a 72 °C por 4 min. O material amplificado foi submetido a eletroforese em gel preparativo de agarose. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e as bandas correspondentes a cada cassete foram removidas do gel com auxílio de uma lâmina de bisturi. O DNA foi purificado por eletroeluição nas condições de 100 V por 15 a 20 min em tampão TBE 1X.

3.11.4 Transfecção com os cassetes para nocaute e seleção dos parasitas resistentes

Foram coletadas por centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos a 4 °C, 1×10^8 células para transfecção de *T. cruzi*. O sedimento foi lavado com PBS 1X esterilizado e ressuspenso em 1 mL de solução de eletroporação (NaCl 140 mM; Hepes 25 mM; Na_2HPO_4 75 mM). Volumes de 400 µL da suspensão de parasitas foram transferidos para cubetas de eletroporação (0,2 cm de GAP) esterilizadas (BioAgency) pré-resfriadas. Para transfecção de *T. cruzi* foram usados 20 µg de cada cassete para nocaute (Higro ou Neo). O DNA foi adicionado diretamente à suspensão de parasitas e após incubação de 10 minutos em banho de gelo, as cubetas foram submetidas a 2 pulsos de 450 volts, 500 µF em eletroporador *GenePulser II Electroporator* (Bio-Rad). Como controle da transfecção, foram usadas cubetas contendo somente a suspensão de parasitas. As cubetas foram incubadas novamente por 5 a 10 minutos em banho de gelo, e em seguida as células foram transferidas para garrafas de cultura de 10 ml contendo meio LIT (suplementado com 10.000 U de penicilina e estreptomicina a 10 µg/ml). As culturas foram então incubadas a 27 °C por 24 horas. Decorrido o tempo de incubação, adicionou-se às culturas ou o antibiótico G418 ou higromicina (250 µg/ml) para seleção de *T. cruzi* carreando o cassete nocaute Neo ou o cassete nocaute Higro, respectivamente. As culturas foram mantidas por sucessivas passagens até a ausência de proliferação celular nas culturas controle (suspensão de parasitas sem adição de DNA). Os clones foram obtidos através de diluição limitante nos meios de cultivo e o DNA genômico de cada um foi posteriormente avaliado por PCR, a fim de confirmar a modificação genética.

3.11.5 Análise do DNA total dos parasitas transfectados com os cassetes para nocaute

A fim de verificar a inativação do gene *Tcsti-1* pela inserção dos cassetes para o nocaute gênico na região correta do DNA genômico dos parasitas transfectados, foram efetuadas reações de PCR utilizando os iniciadores MKSTICHECK-F (anela com região 3' do gene Tc00.1047053506321.280 a montante de *Tcsti-1*) e HIGRO-R ou NEO-R (anela com região 3' do gene *hyg* ou *neo*); ou MKSTICHECK-RNEW (anela com região 5' do gene Tc00.1047053506321.300 a jusante de *Tcsti-1*) e HIGRO-F ou NEO-F (anela com região 5' do gene *hyg* ou *neo*), mostrados na tabela a seguir.

TABELA 3.4 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA ANÁLISE DO DNA TOTAL DOS TRANSFECTANTES

DESCRIÇÃO	SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS*	Tm**(°C)
Iniciadores para verificar inserção correta do cassete nocaute no DNA genômico de <i>T. cruzi</i>	MKSTICHECK-F: AGCGCGCGTGATCGTTTATTGA	55
	MKSTICHECK-RNEW: CTGCGGCTTGTCCTGCACCTTAC	
Iniciadores que flanqueiam gene <i>hyg</i> ou gene <i>neo</i>	HIGRO-F: AGCTTCTAGAATGAAAAAGCCTGAACTCACC	55
	HIGRO-R: TCGGTCGGAATCCACTCTATTCTTTGC	
	NEO-F: GGGGTCGACATGATTGAACAAGATGGATTG	
	NEO-R: GGGGAATTCAGAAGAACTCGTCAAG	

* Todas as sequências estão apresentadas na direção 5' → 3'

** Temperatura de anelamento dos iniciadores

As reações foram preparadas em um volume final de 50 µL contendo 50 ng de DNA genômico do transfectante, 200 µM de cada dNTP, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 U da enzima Taq DNA polimerase e tampão específico

para a enzima (Invitrogen). O programa usado para amplificação foi: 94°C por 4 min, 30 ciclos a 94°C por 30 s, 55°C por 30 s, e 72°C por 2 min, com uma etapa final de extensão a 72°C por 4 min. Os produtos de PCR foram analisados posteriormente por eletroforese.

3.11.6 Curva de crescimento e diferenciação de *T. cruzi*

A capacidade de multiplicação dos parasitas com gene *Tcsti-1* inativado (mutante) foi avaliada pelo cultivo de formas epimastigotas por 9 dias e comparada com células de *T. cruzi* selvagem cultivadas em paralelo. Formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (Epi 3 dias) foram transferidas para 100 mL de meio LIT de modo a obter uma densidade celular de 10^6 células/mL. Os cultivos foram realizados em triplicata e a cada 24 horas uma alíquota do sobrenadante das culturas foi coletada para efetuar a contagem do número de células em câmara de Neubauer e também para preparar lâminas para coloração de parasitas para visualização em microscópio de luz, descrito no item 3.13.3.

A fim de verificar a capacidade de diferenciação do parasita com o gene *Tcsti-1* inativado comparada ao parasita selvagem, foi realizado o processo de metaciclogênese *in vitro* (conforme descrito nos itens 3.6.4 e 3.6.5) com ambas as linhagens e em garrafas de cultivo de 25 cm³. A cada 24 horas foram coletadas alíquotas do sobrenadante das garrafas contendo os parasitas nocaute e selvagem em meio TAU3AAG para efetuar a contagem diferencial (número de epimastigotas e número de tripomastigotas metacíclicos) em câmara de Neubauer, bem como para preparar lâminas para coloração de parasitas para visualização em microscópio de luz (descrito no item 3.13.3) e para análises de morfologia e viabilidade celular (descritas no item 3.13.2). Além das três garrafas de cultivo (três réplicas biológicas)

utilizadas nas contagens de cada linhagem de parasitas (mutante ou selvagem), foram mantidas 3 garrafas a mais para cada réplica para permitir a coleta a cada 24 horas das células aderidas às garrafas e das células no sobrenadante, para posterior análise de ciclo celular e viabilidade e morfologia, como descrito no item 3.13.2.

Paralelamente parasitas com gene *sti-1* inativado e parasitas selvagens foram cultivados nas mesmas condições e em triplicata, para o preparo de extratos para análise proteômica por espectrometria de massas (LC/MS/MS). Neste caso foram preparados extratos protéicos com formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (Epi 3 dias), epimastigotas em fase final de logarítmica de crescimento submetidos a estresse nutricional (Epi stress) por incubação em meio TAU por 2 horas, e epimastigotas aderidos ao substrato por 24 horas (EPI ader). As células foram coletadas por centrifugação a 8.000 x g, 5 minutos, 4 °C. O sedimento celular foi lavado três vezes com tampão PBS 1X antes de ser ressuspensionado na proporção de $1,25 \times 10^6$ células/ μ L de tampão de lise para proteômica (Uréia 7M, Tiouréia 2M, DTT 1mM, NOT 1%, mix de nucleases-Promega, mix inibidor de protease-*Protease inhibitor cocktail EDTA-free*-Roche). Após incubação em banho de gelo por 30 minutos, os restos celulares foram sedimentados por centrifugação a 14.000 x g por 20 minutos a 4 °C, e a fração do sobrenadante correspondente ao extrato protéico foi coletada e mantida a -80 °C até o momento da análise proteômica. A partir de cada réplica biológica foram preparados dois extratos para proteômica.

A análise estatística dos dados obtidos na contagem do número de células foi feita através da Análise de Variância (ANOVA) de fator único.

3.12 SILENCIAMENTO DO GENE *Tbsti-1* POR INTERFERÊNCIA DE RNA EM *T. brucei*

Nos estudos de genética reversa, a inativação transitória de um gene pode ser obtida a partir da indução de mecanismos de interferência de RNA. Primeiramente plasmídeos carregando uma sequência específica do gene que se deseja silenciar são introduzidos nas células em estudo. A seguir é feita a indução da expressão desse plasmídeo, gerando moléculas de RNA dupla fita que serão processadas por um conjunto de enzimas (Dicer, Argonata, RISC). As pequenas moléculas de RNA de interferência (siRNA) produzidas interagem especificamente com as moléculas de RNAm do gene que se pretende silenciar. O bloqueio da expressão do gene se obtém através da inibição do processo de tradução e/ou da indução da degradação desses RNAm formados. A vantagem deste método de inativação gênica sobre os métodos clássicos de nocaute gênico é a possibilidade de induzir o silenciamento num momento e por um período determinados.

Contudo esse método não pode ser utilizado em qualquer tipo celular, visto que alguns eucariotos não possuem a maquinaria enzimática completa para produzir interferência de RNA, como ocorre para *T. cruzi* (Da ROCHA *et al.*, 2004). Por este motivo utilizamos nestes experimentos o parasita *T. brucei* e avaliamos o silenciamento do gene ortólogo *Tbsti-1*.

3.12.1 Amplificação de porção 3' do gene *sti-1* de *T. brucei*

A amplificação de um segmento entre os nucleotídeos 929 e 1358 do gene *Tbsti-1* foi realizada em um volume final de 50 µl contendo 100 ng de DNA genômico de *T. brucei*, 200 µM de cada dNTP, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (MKJURNAI-F 5'AGAGAAGCTTGTGCCTCCAGAACTCAAGC3' e MKJURNAI-R

5'GAGAGGATCCGTATGCCTGCATGGCCTTAT3'), 1,5 U da enzima Taq DNA polimerase *Platinum High Fidelity* e tampão específico para a enzima (Invitrogen). A reação de PCR ocorreu nas seguintes condições: 94 °C por 4 min, 30 ciclos a 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, e 72 °C por 1 min, com uma etapa final de extensão a 72 °C por 4 min. O produto de PCR de 430 pb foi purificado utilizando o kit *High Pure PCR Product Purification* (Roche) segundo as orientações do fabricante.

3.12.2 Clonagem do segmento 3' do gene *Tbsti-1*

Na clonagem de parte do gene *sti-1* de *T. brucei* foram utilizadas enzimas de restrição e modificadoras de DNA, segundo as orientações dos fornecedores (Invitrogen, New England Biolabs, Promega). Para produzir o plasmídeo para induzir RNA de interferência em *T. brucei*, o fragmento de DNA de 430 pb obtido foi clonado no vetor p2T7-177, previamente digerido com a enzima *XcmI*, originando o plasmídeo p2T7-177STI.

3.12.3 Transfecção e seleção dos parasitas

O processo de transfecção e seleção dos parasitas foi realizado de modo semelhante ao descrito no item 3.12.4, com as seguintes modificações. Foram coletadas por centrifugação 1×10^7 células para transfecção de *T. brucei* com 10 µg do vetor p2T7-177STI, previamente linearizado com a enzima de restrição *NotI*. Logo após a transfecção, as células foram transferidas para garrafas de cultura de 10 mL contendo meio SDM-79 para *T. brucei* e as culturas foram então incubadas a 27 °C. Depois de 24 horas de incubação, adicionou-se às culturas o antibiótico fleomicina (2,5µg/mL) para seleção dos parasitas que portavam o plasmídeo p2T7-177STI.

3.12.4 Indução de interferência de RNA em *T. brucei*

Células de *T. brucei* contendo o plasmídeo p2T7-177STI foram inoculadas em meio SDM-79 (contendo 2,5 µg/mL de fleomicina) em garrafas de 25 mL a uma densidade de 10^6 parasitas/mL. Para induzir a interferência de RNA (síntese de RNA dupla fita) foi adicionado à cultura o antibiótico tetraciclina (1,5 µg/mL). Alíquotas das culturas foram coletadas diariamente para a contagem do número de parasitas em câmara de Neubauer e também para o preparo de extratos protéicos, a fim de se obter uma curva de crescimento e acompanhar a inibição da expressão do gene *Tbsti-1* através de *Western Blotting*. O experimento foi realizado em triplicata e como controle foram utilizadas culturas sem adição de tetraciclina. A análise estatística dos dados obtidos na contagem do número de células foi feita através da Análise de Variância (ANOVA) de fator único.

3.13 ENSAIOS CITOLÓGICOS

3.13.1 Ensaios de imunolocalização por fluorescência indireta

A localização celular da proteína STI-1 de *T. cruzi* foi verificada em parasitas nas formas epimastigotas (3 dias, 5 dias e sob estresse nutricional) e tripomastigotas metacíclicos. As diluições dos antissoros utilizados foram determinadas após vários ensaios.

Os parasitas foram coletados por centrifugação a $7.000 \times g$ por 2 minutos, lavados duas vezes em tampão PBS 1X e depositados sobre uma lâmina de vidro previamente tratada com poli-L-lisina em uma densidade de 10^7 parasitas/mL em PBS. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 20 minutos a temperatura ambiente. Os parasitas aderidos foram fixados com paraformaldeído 4 % em PBS

1X por 10 minutos e depois lavados duas vezes com PBS 1X. As lavagens foram repetidas entre cada uma das etapas seguintes. As células foram tratadas com 50mM de NH₄Cl em PBS 1X por 10 minutos, permeabilizadas com Triton 0,1% em PBS 1X por 2 min a temperatura ambiente e incubadas a 4 °C durante 16 h em solução de bloqueio para imunofluorescência (1,5% de BSA em PBS 1X). Após o bloqueio, os parasitas foram incubados a 37 °C por 1 h com o antissoro produzido em camundongo contra a proteína TcSTI-1 recombinante (diluído 1:60 em solução de bloqueio para imunofluorescência). As lâminas foram lavadas em PBS 1X e incubadas por mais 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa-488 (Sigma) (diluído 1:400 em solução de bloqueio para imunofluorescência) e DAPI (1 µg/µL).

Nos ensaios de co-localização da TcSTI-1 com a TcHSP70 também foi usado o antissoro anti TcHSP70 e como anticorpo secundário, anti-IgG de coelho conjugado a Alexa 546 (Sigma) nas mesmas condições. Lâminas contendo parasitas incubados com soros coletados antes da imunização dos animais (soro pré-imune) foram usadas como controle.

As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência (Nikon E600) utilizando objetiva de 100x. Foram feitas várias tomadas fotográficas de modo a visualizar pelo menos 100 parasitas para cada análise.

3.13.2 Análise da viabilidade, diferenciação e ciclo celular de *T. cruzi* por citometria de fluxo

Os efeitos da ausência do gene *sti-1* sobre o crescimento, diferenciação e ciclo celular de *T. cruzi* também foram avaliados por citometria de fluxo. Nestes

experimentos foram usadas amostras de culturas de *T. cruzi* selvagem e mutante para o referido gene. A viabilidade celular de epimastigotas foi verificada incubando-se 0,5 ml do sobrenadante das culturas com 5 µg/ml de iodeto de propídeo por 10 minutos, a temperatura ambiente. Para os epimastigotas induzidos à diferenciação em tripomastigotas metacíclicos, amostras de células livres no sobrenadante e aderidas na garrafa de cultura foram submetidas ao mesmo tratamento com iodeto de propídeo, e baseados nas características morfológicas foi possível diferenciar epimastigotas (em diferenciação ou não) de tripomastigotas metacíclicos. Em seguida, as amostras foram submetidas ao citômetro de fluxo modelo FACScalibur (Becton & Dickinson, EUA), sendo adquiridos 10 mil eventos para posterior análise no programa WinMDI 2.9.

Para analisar o ciclo celular das amostras já mencionadas, as células foram lavadas por 3 vezes em PBS e suspensas em solução específica (iodeto de propídeo 10 µg/mL; Triton X-100 0,1%; RNase A 10 µg/mL, Etanol 70%) por 15 minutos, sendo submetidas em seguida ao citômetro de fluxo e analisadas conforme descrito anteriormente.

Os dados obtidos nestes ensaios foram analisados estatisticamente através do teste t, considerando um nível de significância de 95%.

3.13.3 Coloração de parasitas para microscopia de luz

A verificação de alterações morfológicas nos parasitas com o gene *sti-1* inativado foi realizada utilizando-se parasitas fixados e corados pelo método panótico rápido (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil) modificado. Alíquotas das culturas de *T. cruzi* selvagem e nocaute do gene *sti-1*, nos meios de crescimento e diferenciação (LIT e TAU3AAG respectivamente), foram depositadas sobre lâminas

de vidro. Depois da secagem, as lâminas foram imersas na solução fixadora por 20 segundos, e em seguida na solução reveladora e subsequentemente na solução corante, no mesmo tempo de incubação. As lâminas foram lavadas suavemente em água corrente, secas a temperatura ambiente e montadas em Permount (Fisher Scientific, Litho, EUA). As células foram observadas em microscópio Nikon E600. Foram feitas várias tomadas fotográficas de modo a visualizar pelo menos 100 parasitas para cada análise.

4 RESULTADOS

No genoma de *T. cruzi* cepa CL Brenner (El-Sayed *et al.* 2005) foi identificado um gene de cópia única ortólogo de *sti-1* (Tc00.1047053506321.290). O quadro aberto de leitura (*Open Reading Frame* - ORF) de 1671 pb codifica 556 aminoácidos que formam uma proteína com massa calculada de 63,1 kDa. Também foram identificados dois alelos truncados contendo 774 pb (Tc00.1047053509757.30 e Tc00.1047053508625.130), denominados *sti-1-like*, que apresentam sequência idêntica de nucleotídeos entre si, mas não apresentam similaridade significativa com *Tcsti-1*, tanto em nível de nucleotídeos, quanto em nível de aminoácidos.

As análises da sequência traduzida do gene *sti-1* de *T. cruzi*, realizadas através do algoritmo BLAST disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov (ALTSCHUL *et al.*, 1990), mostraram uma significativa similaridade com outras proteínas STI-1 que foram descritas em *L. major* (62%), *Homo sapiens* (40%), *Mus musculus* (39%), *Glicina max* (37%) e *S. cerevisiae* (37%). A comparação dessas sequências, mostrada na figura 4.1, indicou que a maioria dos resíduos conservados estão localizados nos motivos TPR (TPR1, TPR2A e TPR2B) que medeiam a ligação da STI-1 às proteínas HSP70 e HSP90, como uma sequência conservada de 10 aminoácidos no domínio TPR1(NHVLYSNRSA) e outra de 6 aminoácidos no domínio TPR2B (YSNRAA).

O gene *Tcsti-1* foi isolado a partir da amplificação da região codificadora, utilizando oligonucleotídeos iniciadores que flanqueavam o início e o final da ORF. O fragmento foi inserido nos vetores pDONR e pDEST conforme descrito no item 3.7.7 de materiais e métodos. Posteriormente, a clonagem do gene foi confirmada através de sequenciamento.

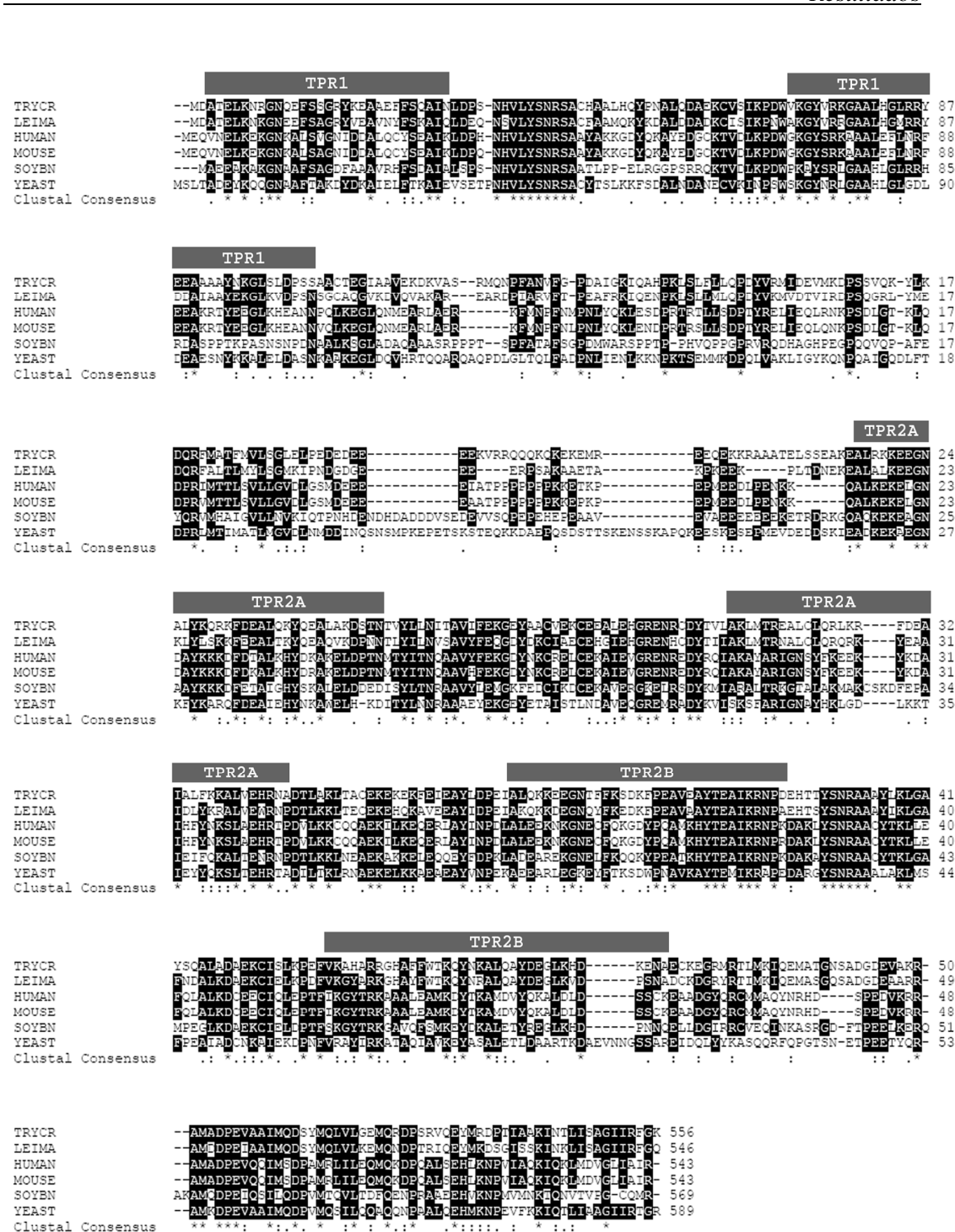


FIGURA 4.1 – COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE PROTEÍNAS STI-1 DE VÁRIOS ORGANISMOS

As seqüências traduzidas do gene *sti-1* de *T. cruzi* (TRYCR), de *Leishmania major* (LEIMA), humana (HUMAN), murina (MOUSE), de soja (SOYBN) e levedura (YEAST) foram analisadas pelo algoritmo ClustalW. As regiões correspondentes aos motivos TPR estão indicados por barras acima do alinhamento e os resíduos conservados estão destacados em preto.

4.1 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE STI-1 DE *T. cruzi* E OBTENÇÃO DE ANTISORO ESPECÍFICO

A proteína TcSTI-1 foi expressa em *E. coli* cepa BL21(DE3)pLysS e apresentou massa molecular relativa em acordo com a massa de 63,1 kDa prevista a partir da sequência do gene (EL-SAYED *et al.* 2005). Após fracionamento do extrato protéico total, verificou-se que a proteína recombinante apresentava-se nas frações solúvel e insolúvel, conforme pode ser observado na figura 4.2.

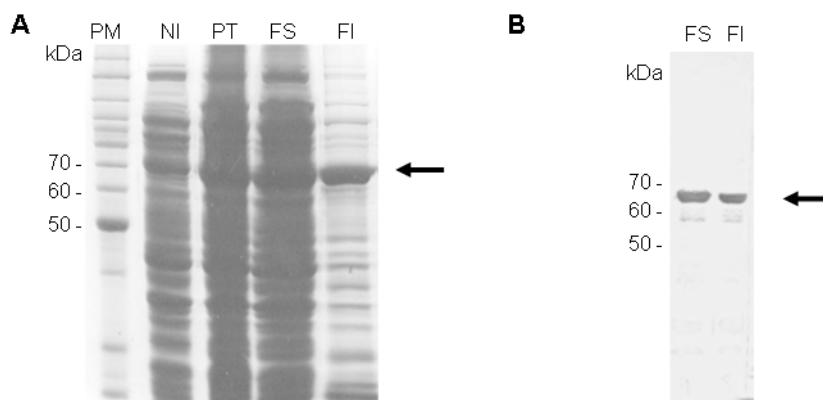


FIGURA 4.2 – EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE TcSTI-1 EM *E. coli*

A) Análise eletroforética dos extratos protéicos de *E. coli* em SDS-PAGE 10% corado com Coomassie Blue; B) *Western Blot* dos extratos protéicos de *E. coli* utilizando anticorpo anti-histidina. Revelação por fosfatase alcalina. PM: Marcador de massa molecular; extratos protéicos provenientes de cultura de *E. coli* não induzida (NI), induzida com 0,1mM de IPTG (PT), fração solúvel (FS) e fração insolúvel (FI). A seta indica a banda correspondente à proteína STI-1 recombinante.

A proteína TcSTI-1 recombinante, expressa a partir do vetor pDEST utilizado, apresenta uma fusão a 6 resíduos de histidina na porção amino-terminal. Essa característica permitiu a purificação da proteína a partir da fração insolúvel por Cromatografia de Afinidade em resina contendo íon níquel imobilizado (Ni^{2+}). A proteína recombinante possui uma cauda de histidinas que apresenta carga negativa quando em tampão alcalino, facilitando sua interação com a resina contendo íons

níquel com carga positiva. Após várias lavagens, a proteína recombinante foi eluída da resina com tampão contendo imidazol, como pode ser observado na figura 4.3A. Como após essa etapa de purificação, a fração eluída apresentava outras bandas além daquela correspondente à proteína STI-1 recombinante, foi necessária uma etapa de purificação adicional a fim de eliminar as proteínas contaminantes. Para tanto, foi realizada eletroforese em SDS-PAGE preparativo, conforme descrito anteriormente, e o resultado obtido após essa etapa de purificação é mostrado na figura 4.3B.

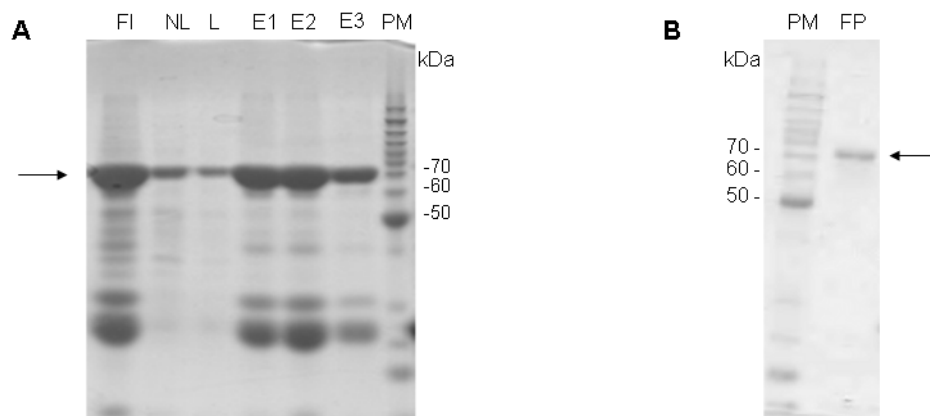


FIGURA 4.3 – PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TcSTI-1 RECOMBINANTE

Análise eletroforética em SDS-PAGE 10% corado com Coomassie Blue das frações protéicas obtidas na purificação por Cromatografia de Afinidade (A) e por SDS-PAGE preparativo (B). PM: Marcador de massa molecular; fração insolúvel (FI); fração não ligada à resina (NL); fração lavada (L) e frações eluídas, primeira (E1), segunda (E2) e terceira (E3) eluições; fração purificada obtida após SDS-PAGE preparativo (FP). A seta indica a banda correspondente à proteína STI-1 recombinante.

A produção de antissoros específicos contra a proteína TcSTI-1 foi realizada a partir da imunização de camundongos com a fração da proteína purificada. A figura 4.4 mostra o resultado da avaliação da reatividade específica obtido com os

antissoros frente à proteína TcSTI-1 recombinante e os extratos protéicos de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os soros obtidos antes da imunização (pré-ímenes) não apresentaram reatividade (dados não mostrados), ao contrário dos antissoros, que foram reativos contra a TcSTI-1 recombinante e também apresentaram reatividade contra extratos protéicos do parasita, reconhecendo especificamente uma banda protéica de tamanho esperado.

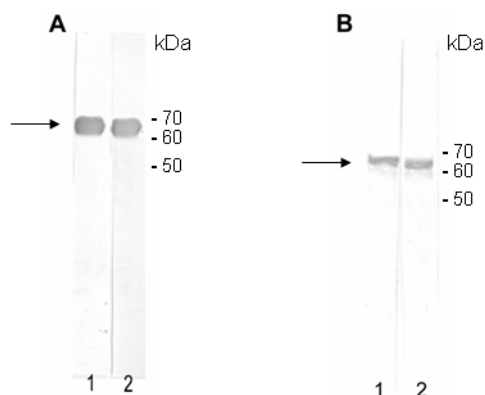


FIGURA 4.4 – AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS ANTISSOROS CONTRA TcSTI-1

Western Blot dos soros ímenes dos camundongos (1 e 2) contra a proteína TcSTI-1 recombinante purificada (A) na diluição de 1:250 e contra extratos protéicos de formas epimastigotas do *T. cruzi* (B) na diluição de 1:100. Revelação por fosfatase alcalina. PM: marcador de massa molecular. A seta indica a banda referente à proteína TcSTI-1.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcSTI-1 EM PARASITAS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Em diversos organismos tem sido demonstrada a indução da expressão de *sti-1* sob choque térmico e outras condições de estresse (NICOLET & CRAIG, 1989; HONORE *et al.*, 1992; LASSLE *et al.*, 1997; HEINE *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2003; SONG *et al.*, 2009). A fim de verificar se esse padrão de indução frente a condições de estresse também era observado em *T. cruzi*, formas epimastigotas do parasita

em fase exponencial de crescimento foram submetidas a estresse nutricional, estresse térmico (37 °C) ou estresse por exposição ao pH ácido (5,0). Estas condições de estresse foram utilizadas pois mimetizam condições enfrentadas pelo parasita ao longo do seu ciclo de vida, tanto no inseto vetor quanto no hospedeiro vertebrado.

4.2.1 Perfil de expressão do gene *sti-1* de *T. cruzi* sob diferentes condições de estresse

Os níveis relativos de RNAm da fração polissomal do gene *Tcsti-1* de parasitas submetidos e não submetidos ao estresse foram quantificados por PCR quantitativa em tempo real. Os níveis de RNAm dos genes *h2b* e *l9* utilizados como controle também foram quantificados. O resultado obtido após a normalização dos dados mostrou que não houve variação significativa ($p>0,05$) dos níveis de RNAm de *Tcsti-1* nos parasitas submetidos aos três tipos de estresse, quando comparados aos parasitas não submetidos a estresse (figura 4.5A).

Além dos níveis relativos de RNAm de *Tcsti-1*, também foram avaliados os níveis protéicos em ensaios de *Western blotting* (figura 4.5B). Os resultados não revelaram diferenças entre os níveis estacionários (*steady-state level*) da proteína TcSTI-1 entre parasitas não submetidos ao estresse e parasitas submetidos às diferentes condições de estresse, em acordo com os resultados obtidos por PCR quantitativa.

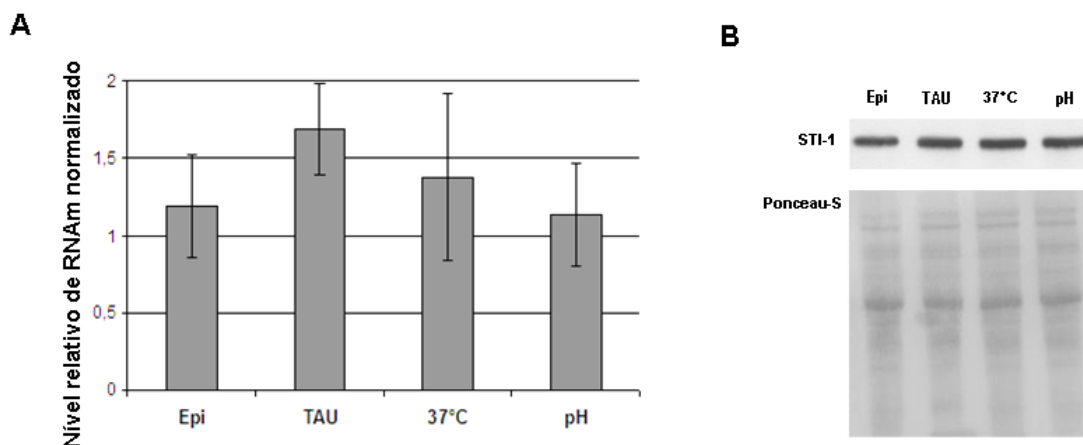


FIGURA 4.5 – PERFIL DE EXPRESSÃO DE *Tcsti-1* EM PARASITAS SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Dados obtidos com parasitas na forma epimastigota em fase exponencial de crescimento não submetidos a estresse (Epi) ou submetidos a estresse nutricional (TAU), estresse térmico (37 °C) ou estresse em pH ácido (pH). A) níveis relativos de RNAm de *Tcsti-1* associado a polissomos, normalizados contra a média dos valores obtidos para os genes controle L9 e H2B. Cada coluna representa os valores da média e as barras, o desvio padrão, a partir de 3 experimentos independentes. B) Ensaio de *Western blotting* de extratos protéicos totais de *T. cruzi* utilizando antissoro anti-TcSTI-1 (1:800), representando um dos resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. Revelação por quimioluminescência. A membrana corada com Ponceau-S é mostrada como controle da quantidade de extrato protéico utilizado (20 µg).

4.2.2 Localização celular da proteína TcSTI-1 em parasitas submetidos ou não a condições de estresse

Buscando verificar a distribuição celular da TcSTI-1, foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta em parasitas na forma epimastigota em fase exponencial de crescimento submetidos ou não ao estresse nutricional. Como a proteína STI-1 é uma co-chaperona conhecida por interagir com proteínas de choque térmico, entre elas a HSP70, os ensaios foram conduzidos de modo a permitir verificar a co-localização de ambas as proteínas.

Os resultados mostraram que TcSTI-1 está localizada no citoplasma de parasitas não estressados e estressados, como pode ser observado na figura 4.6B e 4.7B respectivamente.

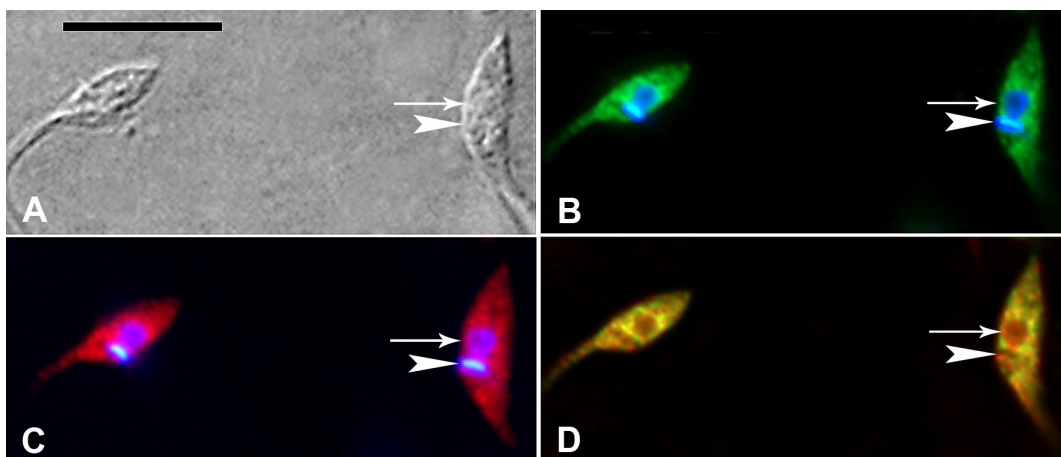


FIGURA 4.6 – IMUNOLOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcSTI-1 E TcHSP70 EM FORMAS EPIMASTIGOTAS NÃO SUBMETIDAS A CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Em (A): parasitas visualizados por contraste interferencial diferencial (DIC); (B): Fluorescência verde indicando a distribuição da TcSTI-1 no citoplasma; (C): Fluorescência vermelha mostrando a localização celular da TcHSP70; (D): Sobreposição das imagens B e C, evidenciando em amarelo a co-localização da TcSTI-1 e da TcHSP70 ao redor do núcleo. Núcleos (indicados pela seta) e cinetoplastos (indicados pela cabeça de seta) foram corados com DAPI e sobrepostos com as imagens em B e C. Barra=10µm.

Um padrão similar foi observado para a proteína TcHSP70 nas formas epimastigotas não estressadas (figura 4.6C), entretanto um aumento de fluorescência foi detectado no núcleo das formas epimastigotas estressadas (figura 4.7C). Este resultado indica que parte da TcHSP70 é translocada para o núcleo quando os parasitas são submetidos a condição de estresse nutricional, similar ao que ocorre quando os parasitas são incubados a 37 °C por 2 horas (MARTIN *et al*, 1993; OLSON *et al*, 1994). Também pode-se observar que parte do sinal

proveniente de TcSTI-1 e TcHSP70 co-localiza ao redor do núcleo, sugerindo a associação entre ambas as proteínas.

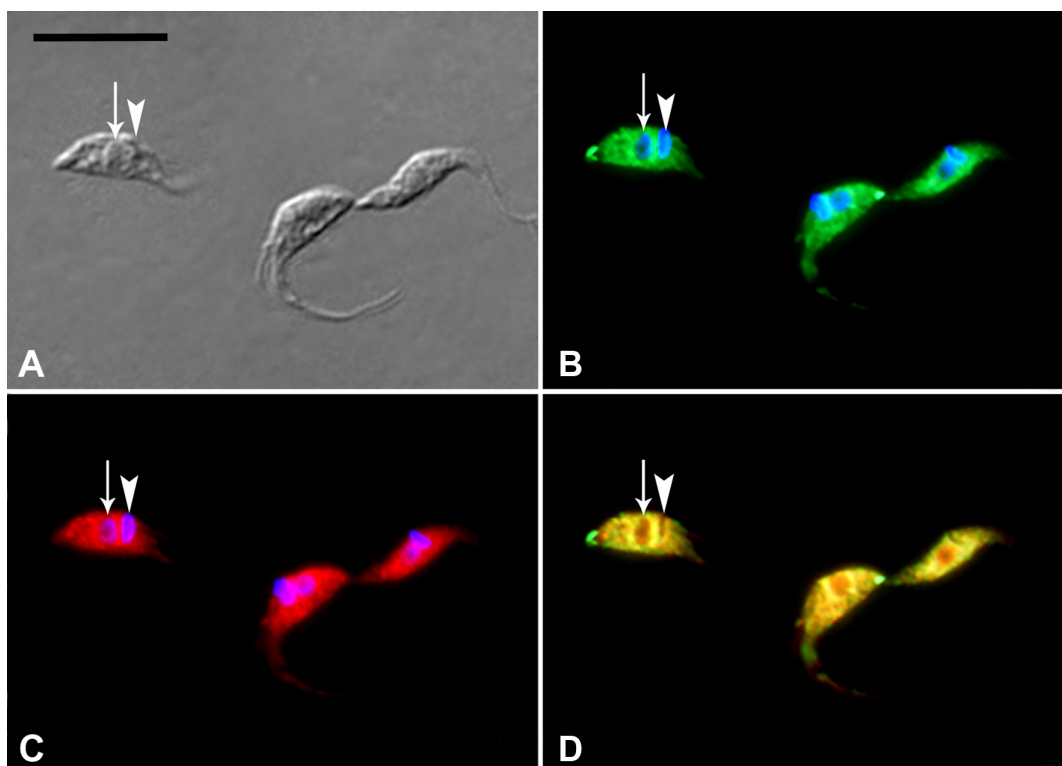


FIGURA 4.7 – IMUNOLOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcSTI-1 E TcHSP70 EM FORMAS EPIMASTIGOTAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE NUTRICIONAL

Em (A): parasitas visualizados por contraste interferencial diferencial (DIC); (B): Fluorescência verde indicando a distribuição da TcSTI-1 no citoplasma; (C): Fluorescência vermelha mostrando a localização celular da TcHSP70; (D): Sobreposição das imagens B e C, evidenciando em amarelo a co-localização da TcSTI-1 e da TcHSP70 ao redor do núcleo. Um aumento do sinal proveniente da TcHSP70 pode ser observado no núcleo dos parasitas. Núcleos (indicados pela seta) e cinetoplastos (indicados pela cabeça de seta) foram corados com DAPI e sobrepostos com as imagens em B e C. Barra=10μm.

Também foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta em parasitas na forma epimastigota em fase exponencial de crescimento submetidos a estresse por temperatura ou por exposição ao meio ácido (resultados não mostrados), os quais apresentaram padrão de distribuição celular da TcSTI-1 e da TcHSP70 similar ao observado para as formas submetidas ao estresse nutricional.

4.2.3 Interação da proteína TcSTI-1 com a proteína TcHSP70

Em paralelo aos ensaios de imunolocalização, foram realizados experimentos de imunoprecipitação a fim de investigar a interação entre as proteínas STI-1 e HSP70 em *T. cruzi*. As frações protéicas obtidas no ensaio foram analisadas por *Western blotting*, mostrando na fração eluída da resina ligada ao antissoro anti-TcSTI-1, a eluição conjunta das proteínas TcSTI-1 e TcHSP70 a partir dos extratos protéicos (figura 4.8A). De modo semelhante, estas proteínas foram também identificadas na fração eluída da resina ligada ao antissoro anti-TcHSP70, como pode ser observado na figura 4.8B. Além disso, é importante ressaltar que nenhuma das duas proteínas foi identificada nas frações eluídas a partir das resinas usadas como controle, como mostrado na coluna 2 das figuras 4.8A e 4.8B. Portanto, estes resultados mostram a co-imunoprecipitação de TcSTI-1 e TcHSP70 e corroboram os resultados obtidos nos ensaios de imunolocalização. Isto reforça que STI-1 se associa com HSP70 nas formas epimastigotas de *T. cruzi*.

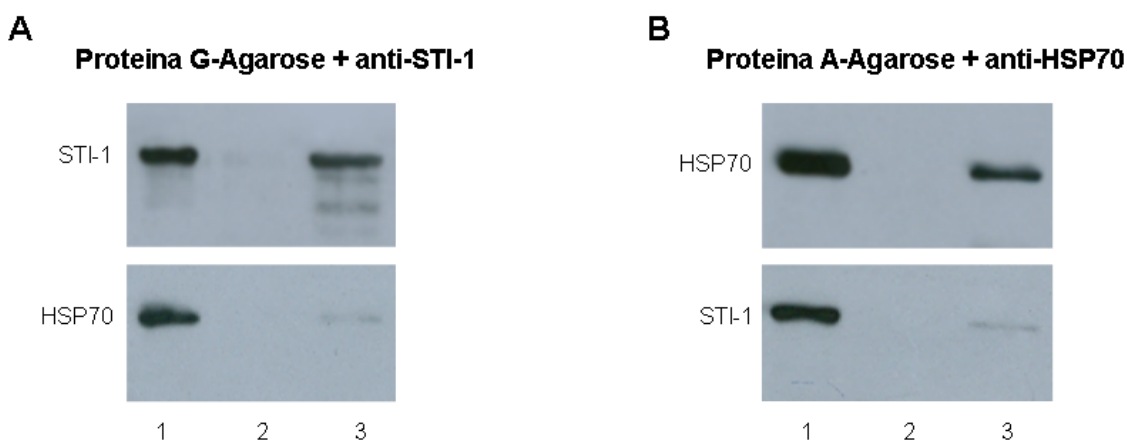


FIGURA 4.8 – CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcSTI-1 E TcHSP70

Resinas de Agarose ligadas a antissoros específicos foram incubadas com extratos protéicos de formas epimastigotas (Epi 3 dias) de *T. cruzi*. As proteínas ligadas foram eluídas, após a etapa de lavagem, e separadas em SDS-PAGE 10% e analisadas por *Western blotting*. Coluna 1: extrato protéico adicionado às resinas; coluna 2: fração eluída da resina usada como controle; coluna 3: fração eluída da resina ligada ao antissoro específico. Esta figura mostra um resultado representativo obtido a partir de dois

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcSTI-1 EM PARASITAS NA METACICLOGÊNESE

Considerando o papel de co-chaperona da proteína STI-1 na formação de multicomplexos com HSPs, bem como sua associação com a proteína príon celular na mediação de sobrevivência e diferenciação neuronal, já descritos em outros organismos eucariotos, foram realizados ensaios buscando encontrar outras proteínas parceiras de TcSTI-1. Além disso, a fim de investigar o papel da STI-1 no ciclo de vida de *T. cruzi*, foi analisado seu perfil de expressão e localização celular no processo de diferenciação das formas epimastigotas para formas tripomastigotas metacíclicas (metaciclogênese), mimetizado *in vitro* em condições quimicamente definidas.

4.3.1 Perfil de expressão da STI-1 de *T. cruzi* em diferentes formas do parasita

A expressão do gene *Tcsti-1* foi avaliada por meio da análise dos níveis de RNAm polissomal através de microarranjo de DNA. Esta plataforma tem sido uma importante ferramenta nos estudos de genômica funcional de *T. cruzi*, realizada em nosso laboratório por Pavoni e colaboradores (dados não publicados). O resultado obtido a partir da análise dos dados revelou uma pequena variação na expressão do gene nas formas epimastigota, tripomastigota metacíclico, tripomastigota sanguíneo e amastigota. Entretanto, a pequena variação observada não se mostrou significativa entre as diferentes formas evolutivas do parasita, como pode ser observado no Apêndice 1.

A análise comparativa dos níveis protéicos de TcSTI-1 foi realizada através de ensaios de *Western blotting*, utilizando extratos protéicos obtidos de parasitas nas formas epimastigota em fase logarítmica de crescimento (Epi3d), epimastigota em final de fase logarítmica de crescimento (Epi5d), epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento submetidos a estresse nutricional (Epi stress) e parasitas tripomastigotas metacíclicos. (Meta). Na figura 4.9 pode ser observado um aumento nos níveis de TcSTI-1 em parasitas Epi stress, quando comparados às formas Epi3d e Epi5d. Este aumento foi estatisticamente significativo ($p<0,05$) comparando-se os níveis protéicos de TcSTI-1 entre Epi3d e Epi stress (figura 4.9B). Já as formas metacíclicas apresentaram uma diminuição significativa nos níveis desta proteína ($p<0,05$), em comparação às formas Epi stress e Epi5d.

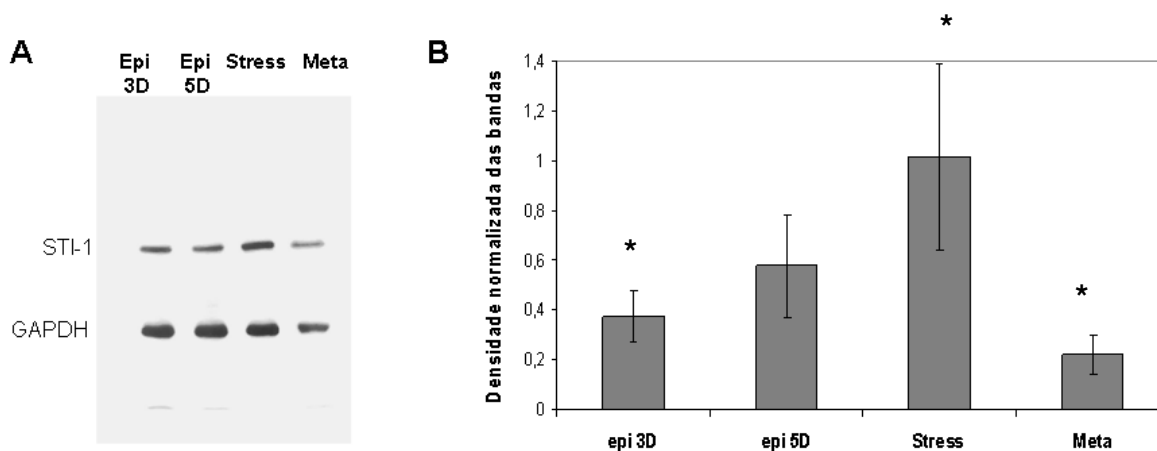


FIGURA 4.9 – PERFIL DOS NÍVEIS DA PROTEÍNA TcSTI-1 EM DIFERENTES FORMAS DO PARASITA

Dados obtidos com parasitas na forma epimastigota em fase exponencial de crescimento (Epi3D), fase tardia de crescimento (Epi5D), fase tardia de crescimento sob estresse nutricional (Stress) e formas tripomastigotas metacíclicas (Meta). Em (A) Ensaio de *Western blotting* de extratos protéicos totais de *T. cruzi* (20 µg) utilizando antissoro anti-TcSTI-1 (1:800), representando um dos resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. Como controle da quantidade de proteína foi utilizado o antissoro anti-TcGAPDH. Revelação por quimioluminescência. Em (B) Intensidade das bandas referentes à proteína TcSTI-1, normalizada contra as intensidades obtidas para TcGAPDH. Cada coluna representa os valores da média e as barras, o desvio padrão, obtido a partir de 3 experimentos independentes. O asterisco sinaliza diferença significativa ($p<0,05$).

Este resultado sugere um aumento do nível da proteína TcSTI-1 em formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento sob condições de estresse nutricional e uma degradação desta durante a metaciclogênese, levando a uma drástica diminuição do nível de TcSTI-1 em tripomastigotas metacíclicos.

Um perfil semelhante nos níveis de TcSTI-1 foi observado na análise proteômica de diferentes formas do parasita durante a metaciclogênese, realizada em nosso laboratório por Lyrís de Godoy e colaboradores (dados não publicados). No Apêndice 2 é mostrado o padrão de expressão de parte das proteínas analisadas, onde pode ser observado o aumento da expressão da TcSTI-1 nas formas Epi stress (em vermelho) e uma diminuição expressiva em Meta (em verde), corroborando o resultado observado nos ensaios de *Western blotting*.

4.3.2 Localização celular da proteína TcSTI-1 em diferentes formas do parasita

Ensaio de imunofluorescência indireta foram realizados a fim de verificar a localização da proteína TcSTI-1 em parasitas nas formas Epi3d, Epi5d, Epi stress e Meta. Na figura 4.10 pode-se observar a proteína distribuída por todo o citoplasma do parasita, com um padrão de fluorescência granular variável em todas as formas analisadas. Nas formas Meta observou-se uma diminuição da intensidade da fluorescência, compatível com a diminuição dos níveis da proteína STI-1 nesta forma do parasita observada nas análises por *Western blotting* e proteômica. Um maior número de grânulos foi observado no citoplasma das formas Epi 5d e Epi stress, com maior intensidade de fluorescência próxima ao núcleo. Além disso, estas formas também parecem apresentar um sinal mais intenso no núcleo, quando comparadas

com as outras formas do parasita analisadas. Estes resultados sugerem que, embora a proteína STI-1 esteja difusa por todo o citoplasma do parasita, também é observada em grânulos citoplasmáticos que aparecem em maior número nas células em final de fase logarítmica de crescimento ou quando submetidas ao estresse nutricional.

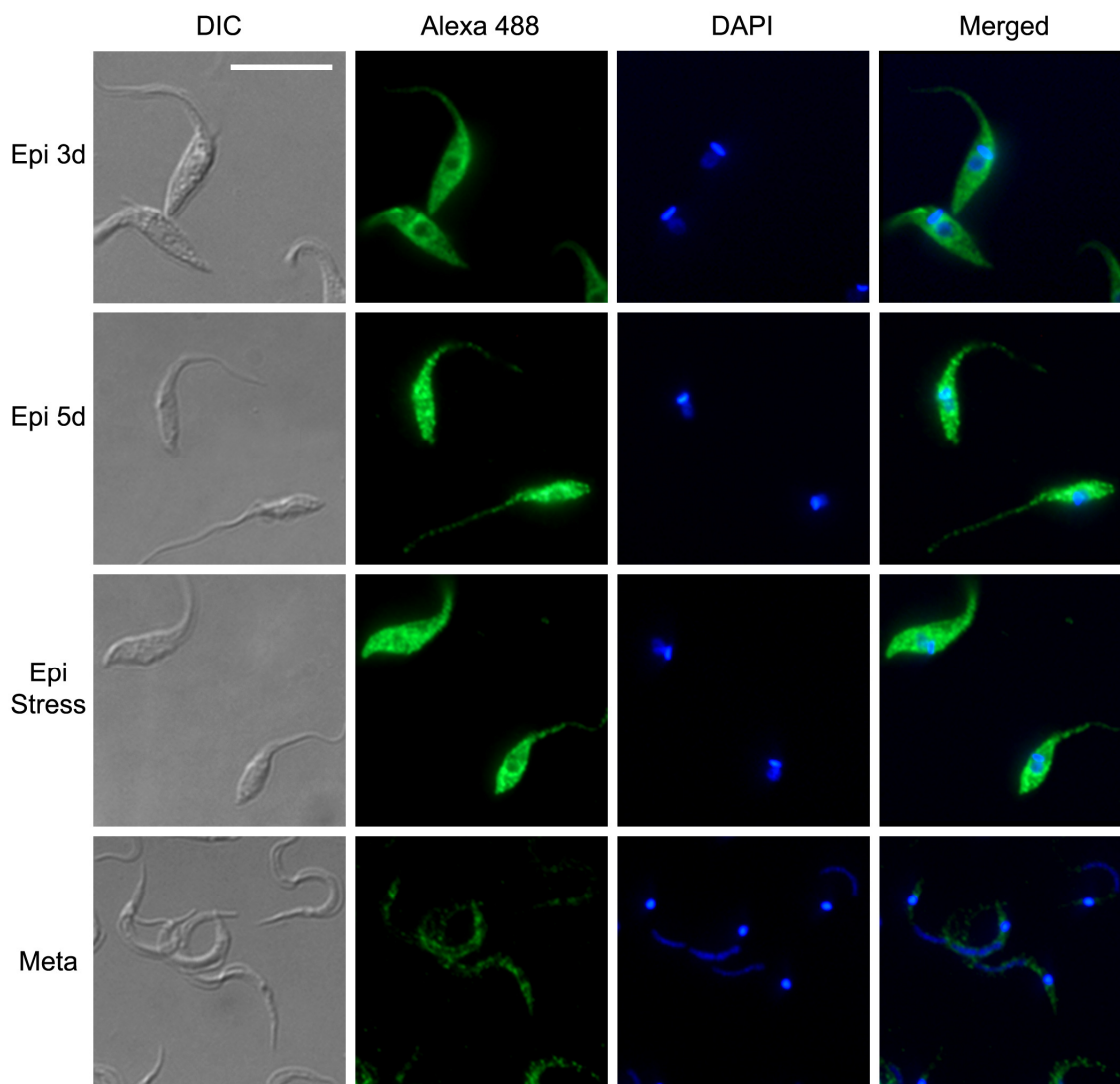


FIGURA 4.10 – IMUNOLOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA TcSTI-1 EM DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DO PARASITA

Imagens obtidas com parasitas na forma epimastigota em fase exponencial de crescimento (Epi 3d), fase tardia de crescimento (Epi 5d), sob estresse nutricional (Epi Stress) e formas tripomastigotas metacíclicas (Meta). (DIC): parasitas visualizados por contraste interferencial diferencial; (Alexa 488): fluorescência verde indicando a distribuição da TcSTI-1 no parasita; (DAPI): núcleos e cinetoplastos; (Merged): sobreposição das imagens. Barra=10µm.

Como já havia sido observada a co-localização da TcSTI-1 e da TcHSP70 em formas Epi3d (descrito no item 4.2.2), também foram realizados ensaios semelhantes nas formas Epi5d, Epi stress e Meta. Os resultados obtidos podem ser observados na figura 4.11, que mostram a distribuição difusa da fluorescência por todo o citoplasma associada a um padrão granular para TcHSP70, semelhante ao observado para TcSTI-1. Além disso, pode-se notar a sobreposição de parte desses grânulos em todas as formas analisadas. Estes resultados indicam que TcSTI-1 e TcHSP70 também co-localizam em outras formas do parasita. No entanto, nas formas Epi 5d e Epi stress foi possível observar que os grânulos sobrepostos aparecem preferencialmente ao redor do núcleo. Também foi possível observar que a proteína TcHSP70 apresentou um aumento da fluorescência no núcleo nestas formas, de modo semelhante ao observado anteriormente para as formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento quando submetidas ao estresse nutricional (descrito no item 4.2.2).

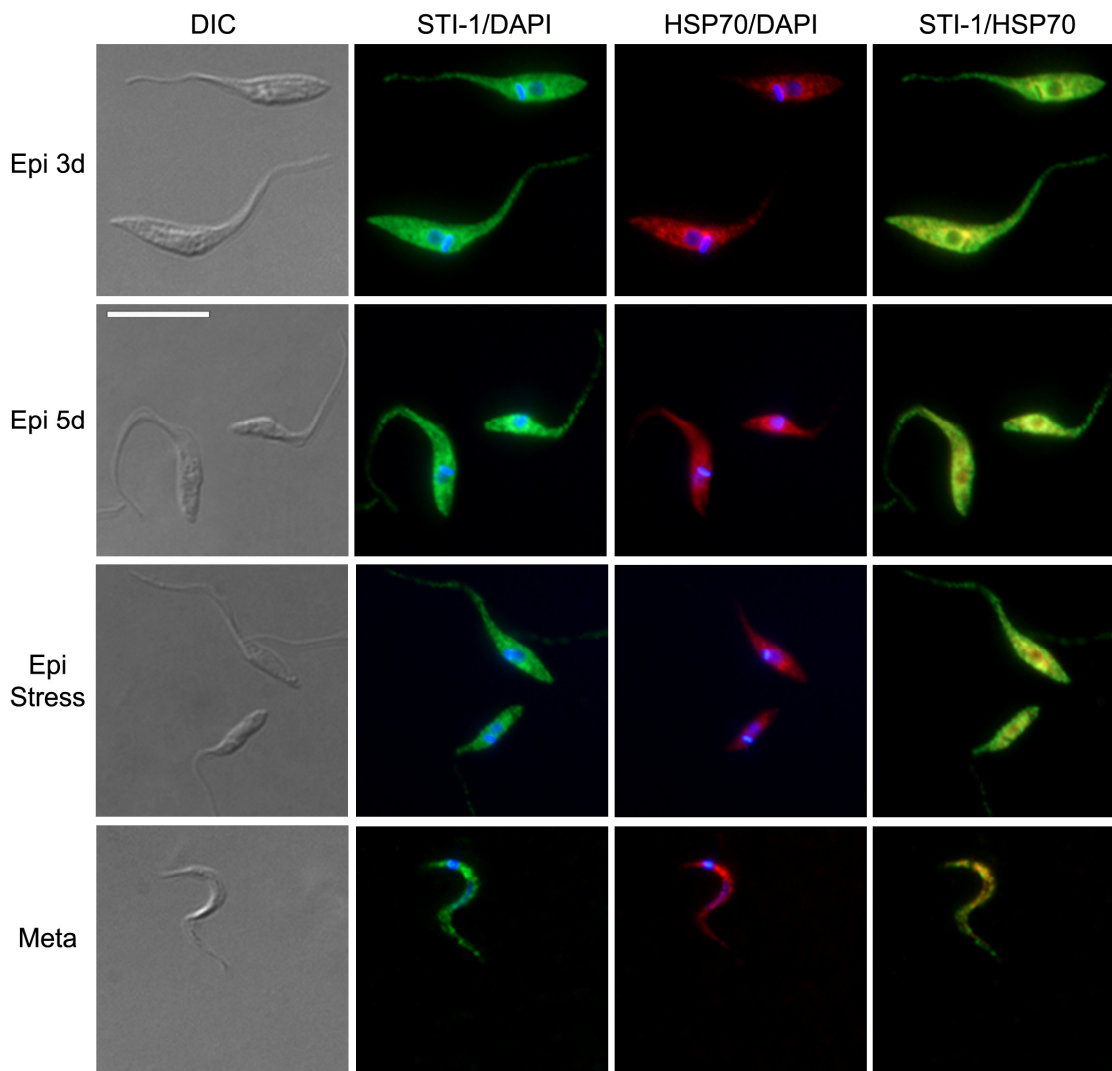


FIGURA 4.11 – IMUNOLocalização das proteínas TcSTI-1 e TcHSP70 em diferentes formas evolutivas do parasita

Imagens obtidas com parasitas na forma epimastigota em fase exponencial de crescimento (Epi 3d), fase tardia de crescimento (Epi 5d), sob estresse nutricional (Epi Stress) e formas tripomastigotas metacíclicas (Meta). (DIC): parasitas visualizados por contraste interferencial diferencial; (STI-1/DAPI): fluorescência verde indicando a distribuição da TcSTI-1 no parasita e núcleo e cinetoplasto corados com DAPI; (HSP70/DAPI): fluorescência vermelha indicando a distribuição da TcHSP70 no parasita e núcleo e cinetoplasto corados com DAPI; (STI-1/HSP70): sobreposição das fluorescências verde e vermelha. Barra=10µm.

Em um trabalho recente observou-se a proteína STI-1 em grânulos de estresse em células Hela (PARE *et al.*, 2009). Também recentemente foi identificada em *T. cruzi* a proteína Dhh1 como componente de grânulos de processamento de RNA (HOLETZ *et al.*, 2007). A fim de verificar se a proteína STI-1 de *T. cruzi* faz parte dos grânulos contendo a Dhh1, foram conduzidos ensaios de imunofluorescência utilizando antissoros específicos contra estas proteínas. Na figura 4.12 pode-se observar o padrão granular de fluorescência de ambas as proteínas nas diversas formas do parasita analisadas. Entretanto, não foi observada sobreposição do sinal proveniente destes grânulos, sugerindo que TcSTI-1 e TcDhh1 não co-localizam em *T. cruzi* e portanto devam constituir estruturas granulares distintas no parasita.

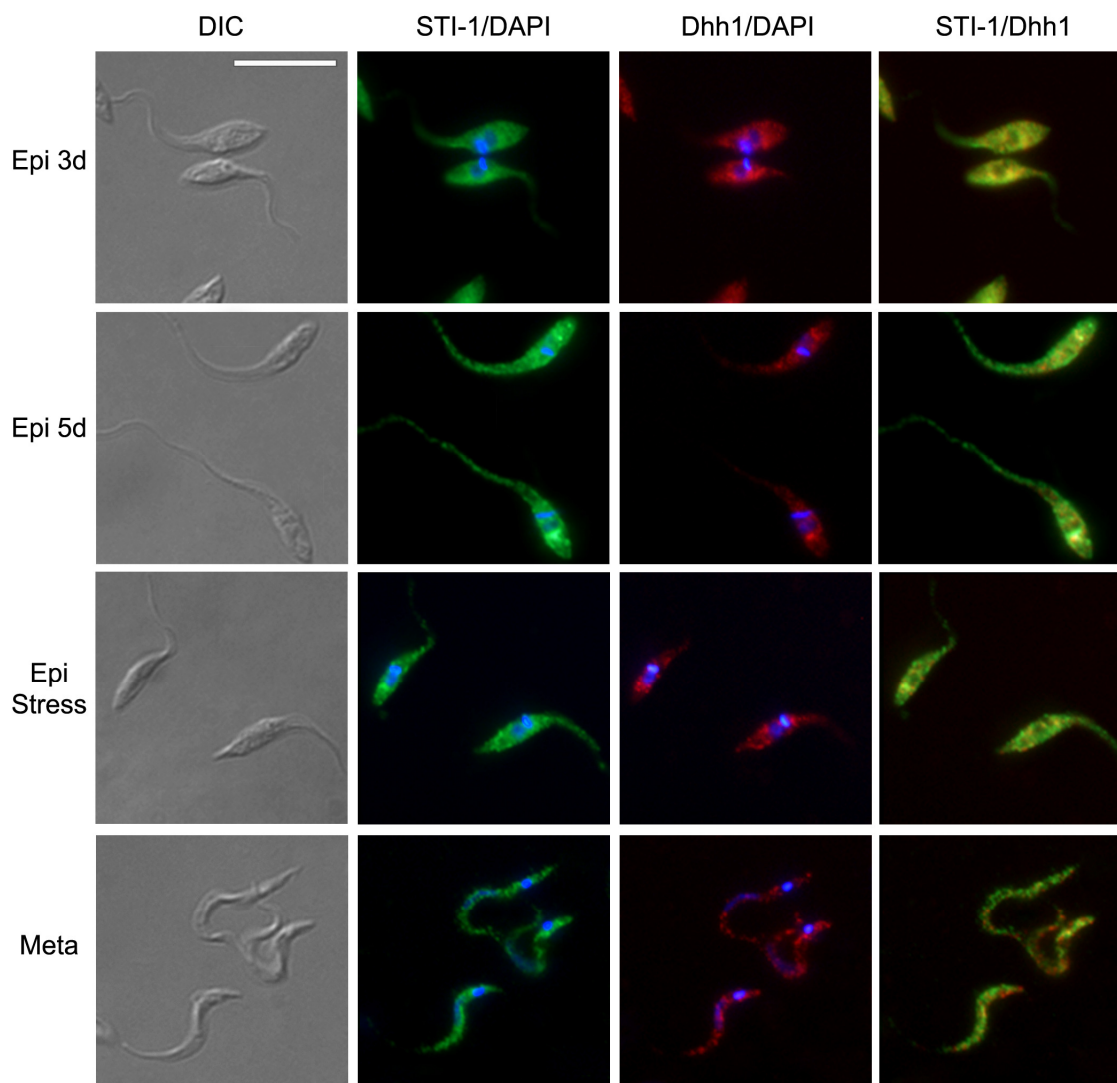


FIGURA 4.12 – IMUNOLOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS TcSTI-1 E TcDhh1 EM DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS DO PARASITA

Imagens obtidas com parasitas na forma epimastigota em fase exponencial de crescimento (Epi 3d), fase tardia de crescimento (Epi 5d), sob estresse nutricional (Epi Stress) e formas tripomastigotas metacíclicas (Meta). (DIC): parasitas visualizados por contraste interferencial diferencial; (STI-1/DAPI): fluorescência verde indicando a distribuição da TcSTI-1 no parasita e núcleo e cinetoplasto corados com DAPI; (Dhh1/DAPI): fluorescência vermelha indicando a distribuição da TcDhh1 no parasita e núcleo e cinetoplasto corados com DAPI; (STI-1/Dhh1): sobreposição das fluorescências verde e vermelha. Barra=10 μ m.

4.3.3 Interação da proteína TcSTI-1 com outras proteínas do parasita

Em experimentos anteriores já havíamos mostrado a associação das proteínas STI-1 e HSP70 em *T. cruzi* (figura 4.8). Contudo, vários trabalhos em diferentes organismos também observaram a associação de STI-1 com a HSP90, formando um multicomplexo chaperona importante para o dobramento adequado de proteínas. Além de sua conhecida interação com chaperonas, em camundongos tem sido descrita a associação da STI-1 com a proteína príon celular (PrpC). Visando contribuir para a compreensão do papel da proteína STI-1 no ciclo de vida de *T. cruzi*, foram realizados ensaios de imunoprecipitação buscando encontrar outras proteínas parceiras de TcSTI-1. Vários testes foram realizados para definir as melhores condições do ensaio, desde a concentração de proteínas do extrato solúvel, até as condições de bloqueio e lavagem. Como os constituintes da fração eluída seriam identificados por espectrometria de massa, estes testes visaram obter frações eluídas com quantidades reduzidas de proteínas contaminantes, sem perdas significativas de proteínas possivelmente associadas à STI-1.

A seguir são mostrados os resultados obtidos para as condições definidas para realização do ensaio de imunoprecipitação, conforme descrito em materiais e métodos (item 3.10.2). Nas figura A e B é possível observar a presença de proteínas nas frações não-ligada às resinas e também nas frações das primeiras etapas de lavagem. A eluição da proteína STI-1 ocorreu somente a partir da resina ligada com antissoro anti-STI-1, não sendo observada a presença da proteína na resina controle (figura 4.13B).

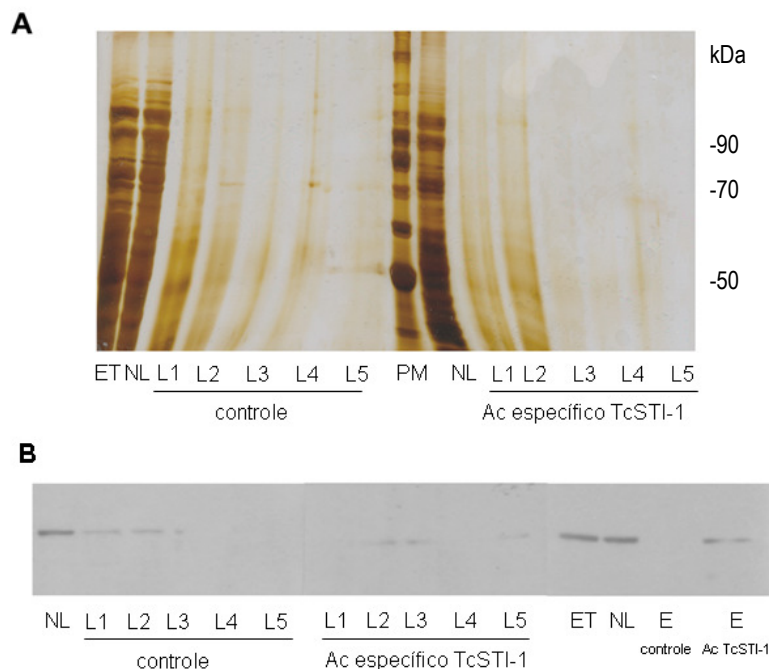


FIGURA 4.13 – IMUNOPRECIPITAÇÃO NAS CONDIÇÕES DE ENSAIO DEFINIDAS

Resinas de Agarose ligadas a soro controle e antissoro específico contra TcSTI-1 foram incubadas com extratos protéicos de formas epimastigotas de *T. cruzi*. A) Análise eletroforética em SDS-PAGE 10% corado com prata dos extratos protéicos de *T. cruzi* e das frações obtidas em cada etapa do ensaio. Estas frações foram concentradas por precipitação com ácido tricloroacético antes da aplicação no gel. B) *Western blotting* das frações obtidas em cada etapa do ensaio (previamente concentradas conforme descrito anteriormente) usando antissoro anti-STI-1 1:200. Revelação por quimioluminescência. Marcador de massa molecular (PM), extratos protéicos de *T. cruzi* (ET), fração não ligada à resina (NL), frações das etapas de lavagem 1, 2, 3, 4 e 5 (L1, L2, L3, L4 e L5), frações eluídas (E).

Uma vez definidas as condições, o ensaio de imunoprecipitação foi realizado com três réplicas biológicas, provenientes de formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (Epi 3 dias) e de formas epimastigotas em fase tardia de crescimento submetidas ao estresse nutricional (Epi stress). Foram usados extratos provenientes de duas formas do parasita para permitir não só a identificação de proteínas associadas a STI-1, mas também para comparar os conjuntos protéicos obtidos a partir de cada forma, que talvez possam ser modificados de acordo com a fase de crescimento e a exposição ao estresse. Embora as frações eluídas tenham

sido obtidas, aguardamos a operacionalização do Espectrômetro de Massas (LC/MS/MS) recentemente instalado no instituto, para realizar a identificação das proteínas presentes nas amostras.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DE PARASITAS COM BLOQUEIO DA EXPRESSÃO DO GENE *sti-1*

Visando contribuir para compreensão do papel da STI-1 no ciclo de vida do parasita, duas abordagens distintas foram utilizadas para bloquear a expressão do respectivo gene. Uma envolveu o silenciamento do gene através de ensaios de RNA de interferência em *T. brucei*, e a outra buscou a inativação do gene em *T. cruzi* através de nocaute gênico. O fenótipo dos parasitas foi avaliado quanto à taxa de crescimento e diferenciação.

4.4.1 Capacidade de proliferação de *T. brucei* com gene *sti-1* silenciado

O protozoário *T. brucei* apresenta gene ortólogo ao gene *sti-1* de *T. cruzi*, o que permitiu realizar o silenciamento gênico naquele protozoário, induzido por tetraciclina, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.12). Durante os ensaios de interferência de RNA foi avaliado o perfil de crescimento, a morfologia dos parasitas e o padrão de expressão da proteína STI-1, como pode ser observado na figura 4.14.

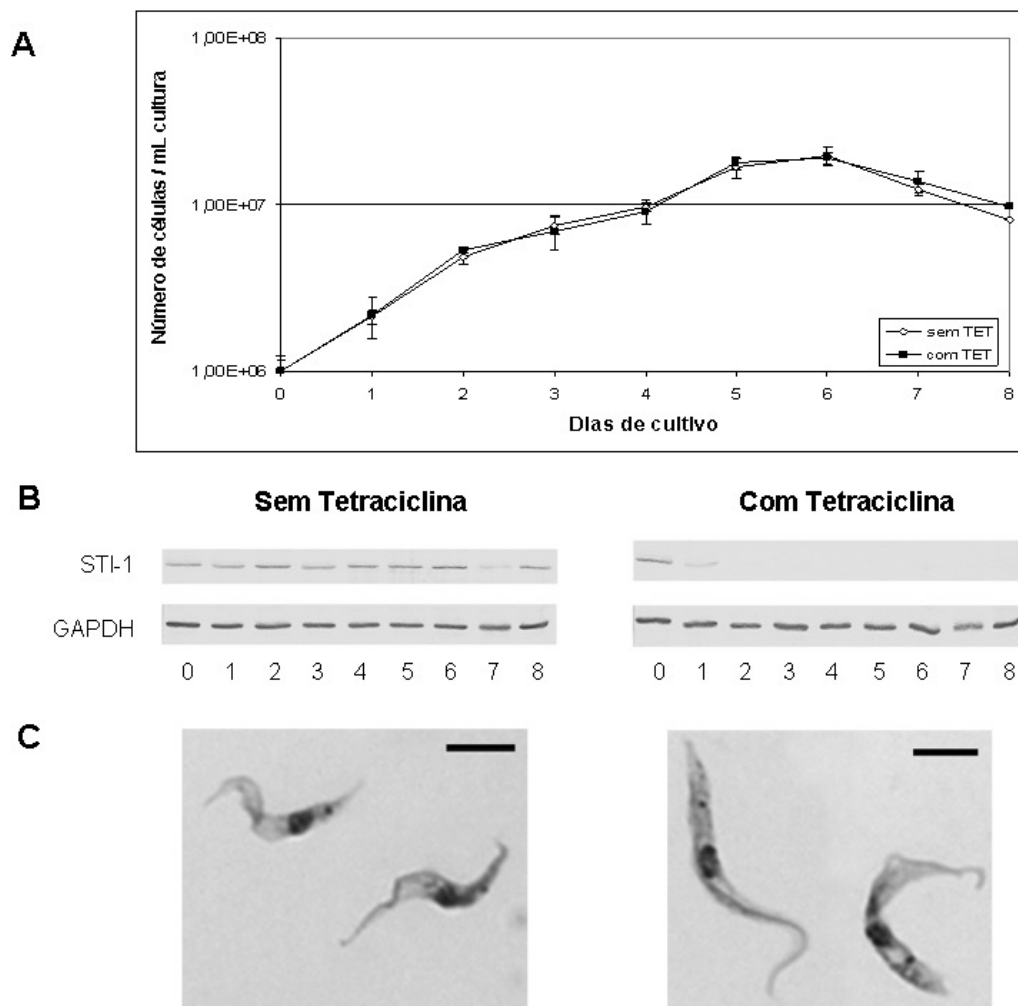


FIGURA 4.14 – CURVA DE CRESCIMENTO E MORFOLOGIA DE *T. brucei* COM GENE *Tbsti-1* SILENCIADO E NÃO SILENCIADO

Células sob indução de interferência de RNA (com tetraciclina – com TET) ou não (sem tetraciclina – sem TET). Em A) perfil de crescimento do protozoário durante 8 dias de cultivo; em B) análise por *Western blotting* dos níveis da proteína TbSTI-1 durante o ensaio, e da proteína TbGAPDH como controle, com revelação por fosfatase alcalina; em C) padrão morfológico dos parasitas observado ao microscópio de luz. Barra=5µm.

Os resultados obtidos não indicaram mudança no perfil de crescimento de *T. brucei* após a indução da interferência de RNA (com tetraciclina), quando comparado com as células não induzidas (sem tetraciclina). Entretanto, a expressão da proteína STI-1 foi reduzida a partir do segundo dia e permaneceu em níveis não detectáveis

até o final do ensaio, indicando que a interferência na expressão do gene *sti-1* de *T. brucei* havia ocorrido como o esperado. Contudo, a inibição da expressão de STI-1 não afetou a capacidade de proliferação de *T. brucei*, sugerindo que a proteína não deve ser essencial para a multiplicação deste protozoário.

A morfologia dos parasitas sob indução da interferência de RNA (com tetraciclina) ou não (sem tetraciclina) também foi avaliada. Na visualização dos parasitas ao microscópio de luz não foi observada diferença morfológica entre as formas induzidas e não induzidas, como pode ser verificado na figura 4.14C, sugerindo que a ausência da proteína TbSTI-1 parece não afetar a morfologia do protozoário.

4.4.2 Capacidade de proliferação de *T. cruzi* com gene *sti-1* parcialmente inativado

Para inativação do gene *Tcsti-1*, foram construídos dois cassetes contendo genes que codificam proteínas que conferem resistência a antibiótico (higromicina ou G418), flanqueados por sequências intergênicas correspondentes a região a montante e a jusante da região codificadora de *Tcsti-1*. A inativação do gene foi efetuada através de sua substituição pelos cassetes contendo os genes de resistência ao antibiótico, pelo processo de recombinação homóloga (item 3.11 de materiais e métodos). Primeiramente foi utilizado o cassete que confere resistência à higromicina, que permitiu a obtenção de parasitas mutantes resistentes ao referido antibiótico. O DNA genômico de parasitas isolados por diluição limitante foi analisado por PCR. Na figura 4.15 pode ser observado que o gene *hyg* foi amplificado na reação de PCR contendo DNA de *T. cruzi* mutante, indicando a inserção do cassete

no genoma do parasita. Para verificar a inserção no locus correto, foram realizadas reações de PCR com iniciadores que anelam genes a montante e a jusante de *Tcsti-1* (MKSTICHECK-F + HIGRO-R ou HIGRO-F + MKSTICHECK-RNEW), conforme esquematizado na figura 4.15E. Foram obtidos fragmentos de DNA de tamanho esperado (1532 e 1644 pb) a partir do DNA de *T. cruzi* mutante (mostrado na figura 4.15 B e C), indicando que a inserção ocorreu como esperado. As reações contendo DNA genômico selvagem como esperado não apresentaram amplificação. Contudo, foi verificado que o gene *Tcsti-1* foi amplificado, tanto a partir de DNA de *T. cruzi* selvagem, quanto de *T. cruzi* mutante, como pode ser observado na figura 4.15D. Esta observação sugere que ocorreu uma inativação parcial do gene *sti-1* no parasita mutante.

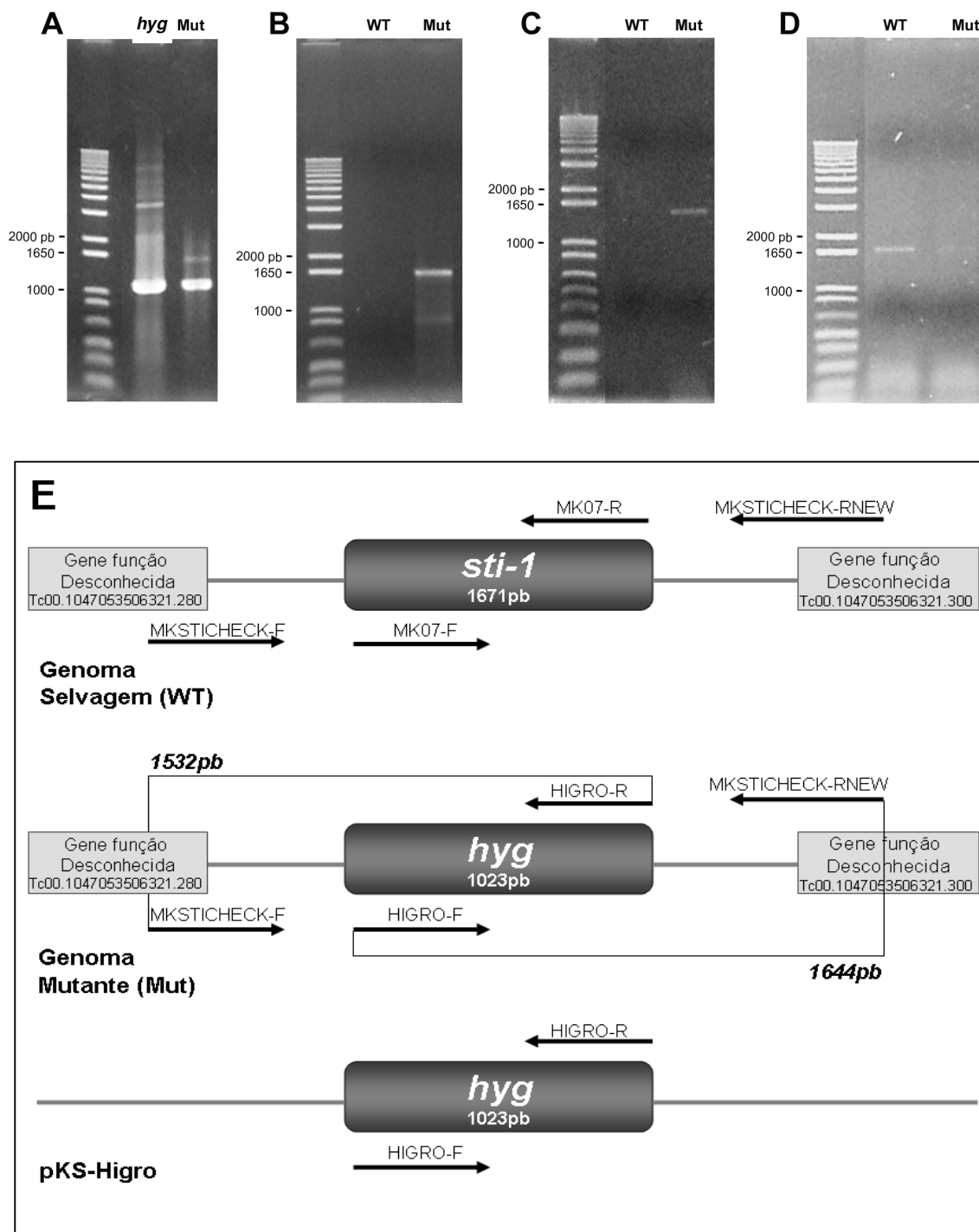


FIGURA 4.15 – ANÁLISE DO DNA GENÔMICO DE *T. cruzi* MUTANTE EM COMPARAÇÃO AO SELVAGEM (WT)

Resultado da PCR com os iniciadores para o gene *hyg* (A); para a região intergênica a jusante (B) e a montante de *Tcsti-1* (C); para o gene *Tcsti-1* (D). Em (E) esquema da organização gênica no locus de *Tcsti-1* e as regiões de anelamento dos iniciadores usados na análise do genoma selvagem (WT) e mutante (Mut), além do esquema do plasmídeo pKS-Higro usado como controle (*hyg*).

A fim de verificar a expressão de *Tcsti-1*, foram realizados ensaios de *Western blotting* utilizando extratos protéicos de *T. cruzi* selvagem e de *T. cruzi* mutante. A comparação dos níveis protéicos de TcSTI-1 na figura 4.16 mostra que embora os parasitas mutantes ainda apresentem a proteína, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) dos níveis de TcSTI-1 (aproximadamente 46%) em relação à forma selvagem. Isto reforça a sugestão de que o gene *Tcsti-1* foi inativado parcialmente e indica a existência de outro alelo no parasita.

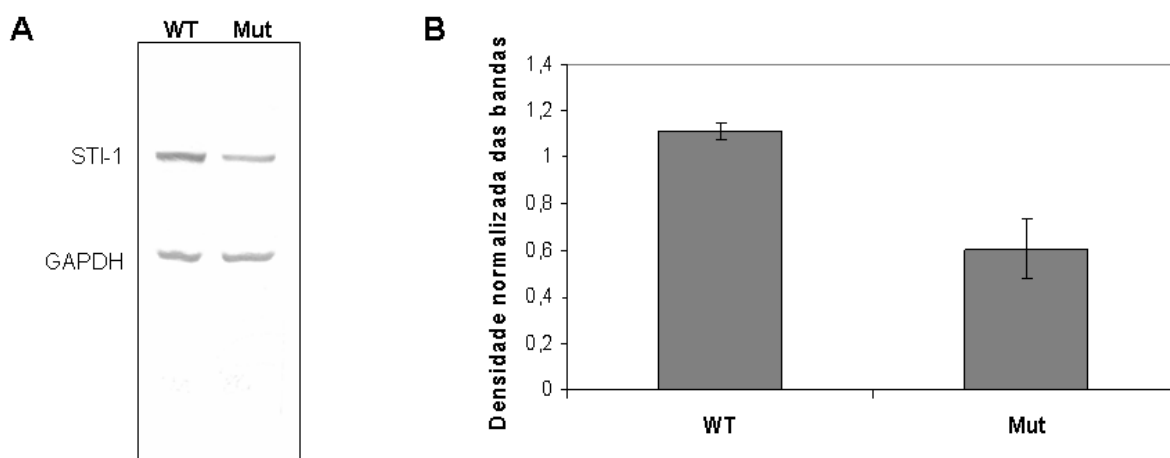


FIGURA 4.16 – PERFIL DOS NÍVEIS DA PROTEÍNA TcSTI-1 NO PARASITA SELVAGEM (WT) E MUTANTE (Mut)

Em A) Ensaio de *Western blotting* de extratos protéicos totais de *T. cruzi* utilizando antissoro anti-TcSTI-1, representando um dos resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. Como controle da quantidade de proteína foi utilizado o antissoro anti-TcGAPDH. B) Intensidade das bandas referentes à proteína TcSTI-1, normalizada contra as intensidades obtidas para TcGAPDH. Cada coluna representa os valores da média e as barras, o desvio padrão, a partir de 2 experimentos independentes ($p < 0,05$).

Buscando a inativação total de *Tcsti-1*, foi utilizado o outro cassete, que confere resistência à G418, para transfecção de *T. cruzi* mutante. Várias tentativas foram realizadas, contudo não foi possível obter parasitas mutantes resistentes aos

dois antibióticos (higromicina e G418) até o momento. Portanto foi investigado somente o fenótipo dos parasitas com inativação parcial do gene *sti-1*, quanto à capacidade de proliferação e diferenciação celular *in vitro*.

A comparação do perfil de proliferação de formas epimastigotas mostrado na figura 4.17, demonstra que não houve diferença na taxa de crescimento de *T. cruzi* mutante em relação ao selvagem. Esta observação corrobora o resultado obtido no silenciamento de *Tbsti-1* em *T. brucei*, onde também não foi observada diferença entre o perfil de proliferação das formas silenciadas e não silenciadas. A taxa de mortalidade celular, avaliada por citometria de fluxo, observada no sobrenadante de ambas as culturas permaneceu inferior a 1% durante todo o ensaio.

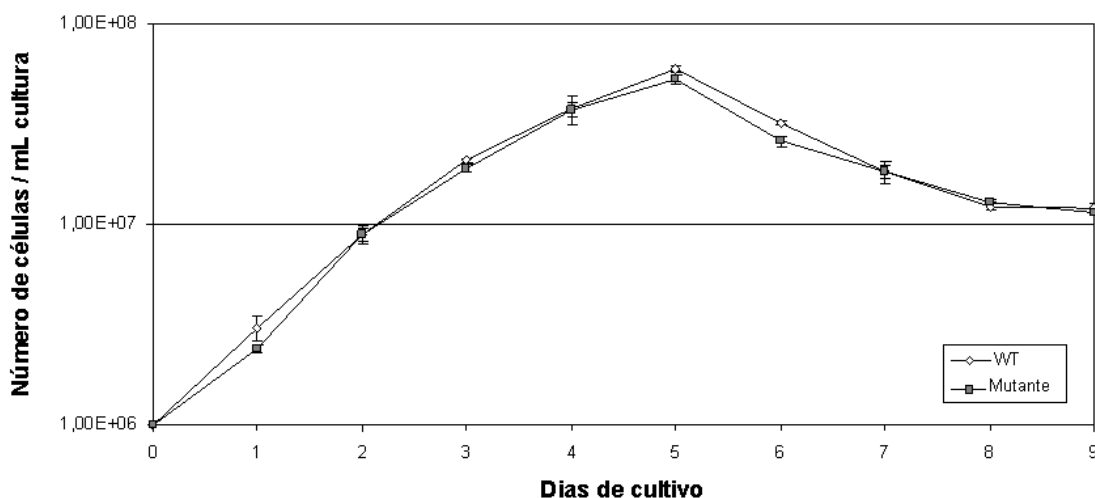


FIGURA 4.17 – CURVA DE CRESCIMENTO DE *T. cruzi* SELVAGEM E MUTANTE

Média do número de formas epimastigotas durante 9 dias de cultivo em meio LIT. Parasitas selvagens (losango branco-WT), parasitas mutantes (quadrado cinza-mutante). As barras correspondem aos desvios-padrão, obtidos a partir de 3 experimentos independentes.

Os parasitas selvagens e mutantes durante o crescimento *in vitro* também foram visualizadas ao microscópio de luz (figura 4.18). Nas formas epimastigotas após 3, 5, 7 e 9 dias de cultivo não foram observadas diferenças morfológicas entre *T. cruzi* selvagem e mutante.

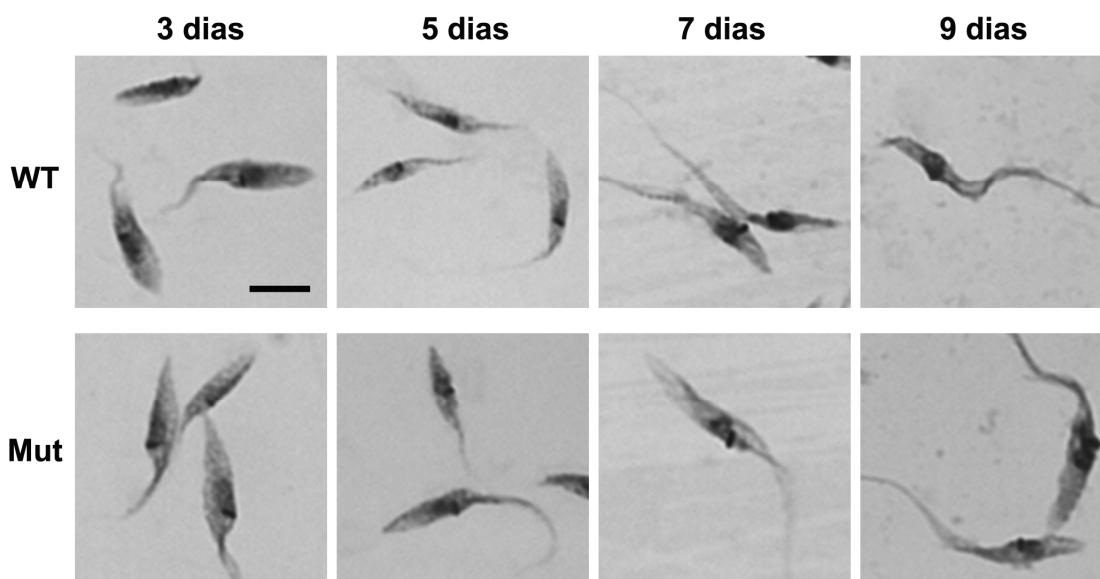


FIGURA 4.18 – ANÁLISE MORFOLÓGICA DE FORMAS EPIMASTIGOTAS SELVAGENS E MUTANTES DURANTE O CRESCIMENTO *in vitro* DE *T. cruzi*

Padrão morfológico de formas epimastigotas selvagens (WT) ou com gene *Tcsti-1* parcialmente inativado (Mut) após 3, 5, 7 e 9 dias de cultivo, observadas ao microscópio de luz. Barra=5µm.

Na análise de ciclo celular também não foi observada diferença significativa no perfil obtido nos parasitas selvagens quando comparado com os mutantes (tabela 4.1). Todos esses resultados indicam que uma diminuição nos níveis de TcSTI-1 não interfere no crescimento e na morfologia de *T. cruzi* e corroboram os resultados observados a partir do silenciamento do gene *sti-1* em *T. brucei*.

TABELA 4.1 – DISTRIBUIÇÃO DO CONTEÚDO NUCLEAR DE ACORDO COM O CICLO CELULAR DE *T. cruzi* SELVAGEM E MUTANTE DURANTE O CRESCIMENTO *in vitro*

Dias de cultivo	SELVAGEM			MUTANTE		
	G1	S	G2	G1	S	G2
3	56,45 ± 5,13	25,16 ± 2,13	19,25 ± 3,19	63,21 ± 3,62	19,65 ± 2,57	17,85 ± 0,80
5	82,50 ± 1,36	7,74 ± 1,69	9,79 ± 0,34	82,12 ± 2,00	7,00 ± 2,10	10,82 ± 0,73
7	66,54 ± 0,50	16,22 ± 1,42	17,09 ± 1,85	72,64 ± 1,53	11,71 ± 0,92	15,6 ± 0,73
9	71,82 ± 1,96	14,64 ± 2,40	13,67 ± 0,74	73,61 ± 1,49	13,02 ± 1,63	13,35 ± 0,55

4.4.3 Capacidade de diferenciação de *T. cruzi* com gene *sti-1* parcialmente inativado

Um estudo recente comparando co-chaperonas presentes em 19 diferentes organismos mostrou que a proteína STI-1 é a mais largamente dispersa entre os organismos (JOHNSON & BROWN, 2009). Embora sua função como mediadora na formação de complexos com HSP70 e HSP90 tenha sido descrita em diversos organismos, estudos realizados em camundongos observaram que uma pequena fração da STI-1 se liga à proteína príon celular na membrana celular e que esta interação parece mediar processos de diferenciação neuronal (ZANATA *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2005; ARANTES *et al.*, 2009).

Buscando avaliar o papel da STI-1 no processo de diferenciação das formas epimastigotas para as formas tripomastigotas metacíclicas, foram realizados experimentos de metaciclogênese *in vitro*, utilizando *T. cruzi* com gene *sti-1* parcialmente inativado e *T. cruzi* selvagem em paralelo como controle. Durante o

processo foi avaliada a taxa de diferenciação através da contagem diferencial em câmara de Neubauer e citometria de fluxo, além de outros parâmetros como a morfologia e a viabilidade celular.

O perfil de diferenciação obtido durante o processo mostrou que os parasitas mutantes apresentaram uma menor proporção (figura 4.19A), bem como um menor número (figura 4.19C), de formas tripomastigotas metacíclicas (Meta) no sobrenadante das culturas durante todo o ensaio, quando comparados com os parasitas selvagens ($p < 0,05$). Além disso, o número de formas epimastigotas encontradas no sobrenadante foi significativamente maior nos parasitas mutantes do que nos selvagens após 48, 72 e 96 horas de diferenciação (figura 4.19B) ($p < 0,05$).

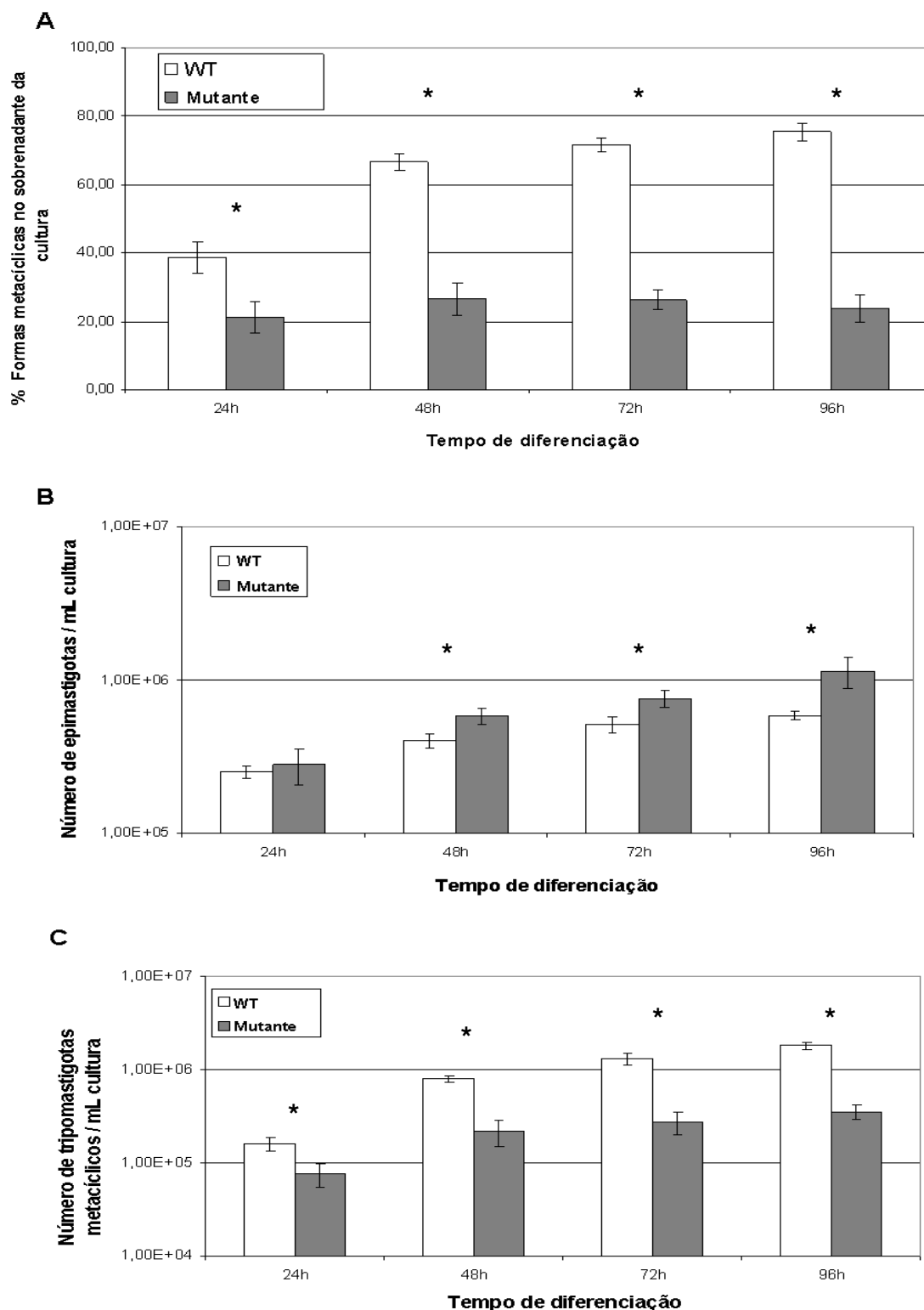


FIGURA 4.19 – PERFIL DE DIFERENCIAÇÃO DE PARASITAS SELVAGEM (WT) E MUTANTE DURANTE A METACICLOGÊNESE *in vitro*

Cada coluna representa os valores da média e as barras, o desvio padrão, obtido em 24, 48, 72 e 96 horas da metaciclogênese, a partir de 3 experimentos independentes. (A) Porcentagem de formas tripomastigotas metacíclicas no sobrenadante das culturas; Número de epimastigotas (B) ou de tripomastigotas metacíclicos (C) no sobrenadante das culturas. O asterisco sinaliza diferença significativa ($p < 0,05$).

Este resultado também foi observado nas análises morfológicas por citometria de fluxo (tabela 4.2 e figura 4.20), que mostram uma proporção menor de formas metacíclicas no sobrenadante das culturas mutantes em relação às selvagens.

TABELA 4.2 – TAXA DE DIFERENCIAÇÃO DE *T. cruzi* SELVAGEM E MUTANTE DURANTE A METACICLOGÊNESE *in vitro* AVALIADA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Tempo de diferenciação	Formas metacíclicas (%)	
	SELVAGEM	MUTANTE
24h	29,77 ± 4,82	12,53 ± 4,14
48h	60,26 ± 2,52	34,60 ± 8,08
72h	39,46 ± 2,05	13,40 ± 2,01
96h	47,88 ± 3,89	20,03 ± 8,88

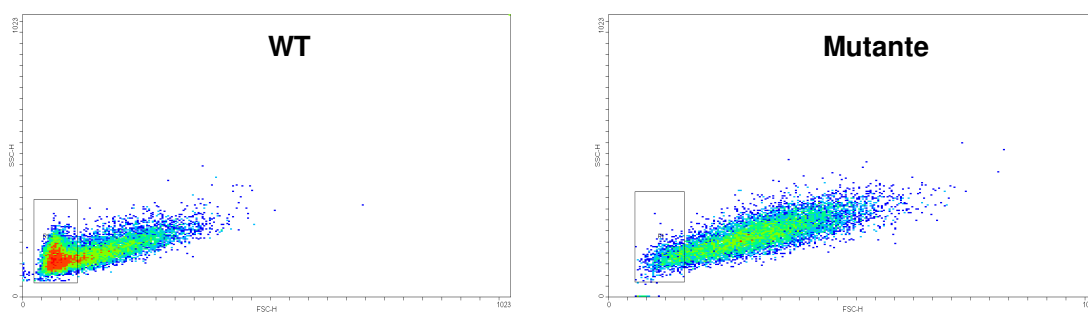


FIGURA 4.20 – PERFIL DE DIFERENCIAÇÃO DE *T. cruzi* SELVAGEM E MUTANTE DURANTE A METACICLOGÊNESE *in vitro* AVALIADO POR CITOMETRIA DE FLUXO

Amostras do sobrenadante das garrafas de cultura de parasitas selvagens (WT) e com gene *Tcsti-1* parcialmente inativado (Mutante) foram avaliadas quanto ao perfil morfológico através de citometria de fluxo. É mostrada a dispersão dos sinais obtidos após 96 horas de diferenciação, indicando no quadrado a região correspondente aos sinais referentes às formas tripomastigotas metacíclicas, destacando em vermelho a maior densidade de sinais e em azul a menor densidade de sinais.

Esta diferença foi observada durante todo o processo de metaciclogênese *in vitro* ($p < 0,05$). Isto reforça o resultado obtido a partir das contagens em câmara de Neubauer, indicando que as células com níveis reduzidos de STI-1 apresentam uma menor taxa de diferenciação do que as células selvagens.

A fim de verificar se a menor taxa de diferenciação dos parasitas mutantes estava relacionada a viabilidade celular, também foi avaliada a taxa de mortalidade das células em cultura por citometria de fluxo. Os dados obtidos, tanto a partir das células aderidas às garrafas de cultura, quanto das células presentes no sobrenadante não mostraram diferença significativa entre as culturas selvagem e mutante, como pode ser observado na tabela 4.3.

TABELA 4.3 – TAXA DE MORTALIDADE DE *T. cruzi* SELVAGEM E MUTANTE DURANTE A METACICLOGÊNESE *in vitro*

Tempo de diferenciação	MORTALIDADE SELVAGEM (%)		MORTALIDADE MUTANTE (%)	
	Aderido	Sobrenadante	Aderido	Sobrenadante
24h	14,31 \pm 3,50	12,55 \pm 2,17	20,42 \pm 3,88	13,06 \pm 1,27
48h	13,63 \pm 1,96	5,55 \pm 2,10	11,00 \pm 3,80	5,57 \pm 1,75
72h	10,76 \pm 1,43	7,14 \pm 1,73	9,12 \pm 2,83	6,53 \pm 0,20
96h	12,14 \pm 0,29	5,14 \pm 1,81	11,50 \pm 0,76	6,50 \pm 0,16

Em paralelo, também foi realizada a análise do ciclo celular (figura 4.21) dos parasitas aderidos às garrafas de cultura que revelou comportamento diferente dos parasitas mutantes durante a metaciclogênese *in vitro*. Foi verificado que os parasitas

mutantes apresentaram maior proporção de células nas fases S+G2 quando comparados aos parasitas selvagens. Esta diferença, embora pequena, foi observada durante todo o processo e foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para as fases G1 e G2 após 72 horas de diferenciação, e para as fases G1, S e G2 após 96 horas de diferenciação (indicado pelo asterisco). Estes dados sugerem que a menor taxa de diferenciação dos parasitas com níveis reduzidos de STI-1 possa estar relacionada ao comprometimento das células com o processo de diferenciação.

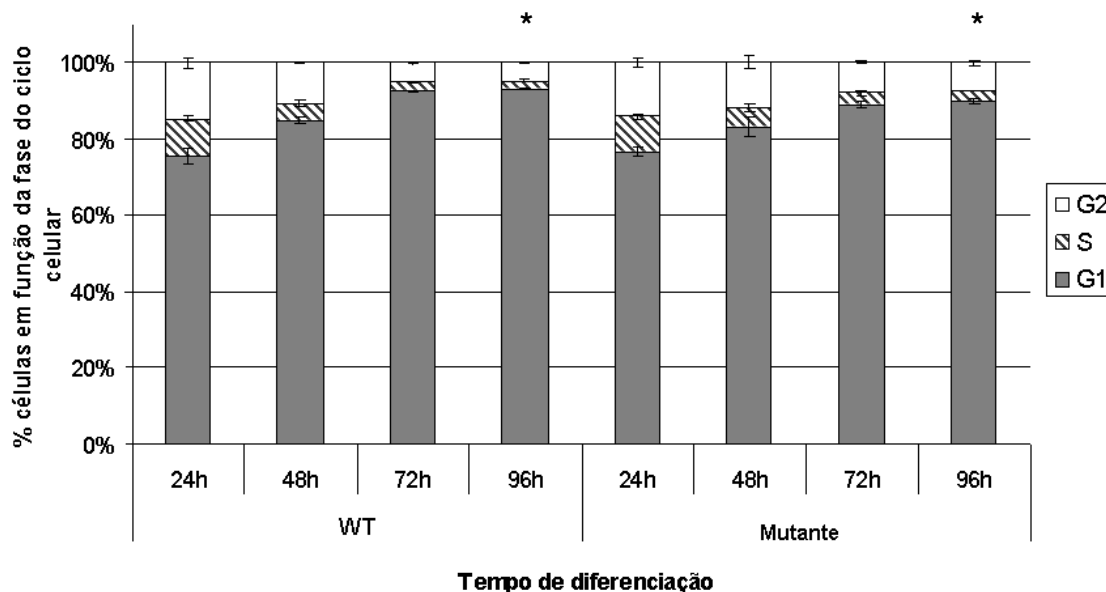


FIGURA 4.21 – DISTRIBUIÇÃO DO DNA NUCLEAR DE ACORDO COM A FASE DO CICLO CELULAR DURANTE O PROCESSO DE METACICLOGÊNESE *in vitro* DE *T. cruzi* SELVAGEM E MUTANTE

Foram analisados parasitas selvagens (WT) e com gene *Tcsti-1* parcialmente inativado (Mutante), aderidos às garrafas de cultura após 24, 48, 72 e 96 horas de diferenciação. As colunas mostram às médias das porcentagens de células em cada fase do ciclo celular (G1, S e G2) e as barras correspondem aos desvios-padrão obtidos a partir de 3 experimentos independentes. O asterisco sinaliza diferença significativa ($p < 0,05$) entre WT e Mut nas fases G1, S e G2 do ciclo celular.

Parasitas em processo de diferenciação apresentam a maioria de suas células em fase G1, enquanto parasitas em processo de multiplicação apresentam uma proporção aumentada de células nas fases S ou G2 do ciclo celular. Parece que os níveis diminuídos de STI-1 dificultam a parada do ciclo celular em G1 e consequentemente o processo de diferenciação do parasita. Isto sugere que a STI-1 possa exercer um papel relevante na sinalização intracelular relacionada ao disparo do processo de metaciclogênese em *T. cruzi*.

Outro dado interessante é a presença de parasitas com formas atípicas no sobrenadante das culturas mutantes durante o processo de diferenciação, sugerindo que a redução nos níveis de STI-1 além de dificultar a diferenciação, leva a formação de parasitas com alterações morfológicas, como pode ser observado na figura 4.22.

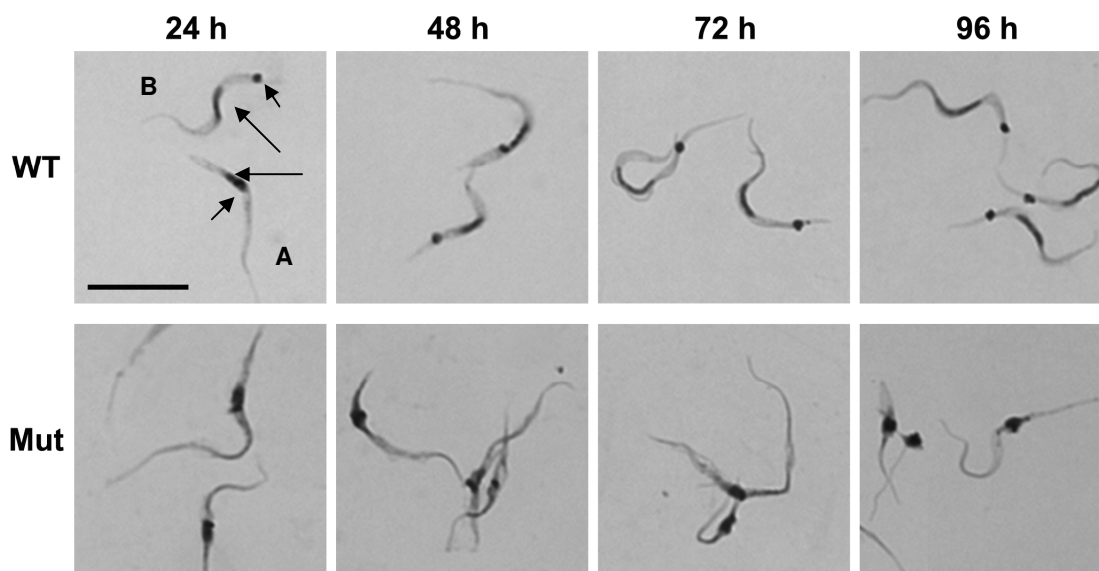


FIGURA 4.22 – ANÁLISE MORFOLÓGICA DE PARASITAS SELVAGEM E MUTANTE DURANTE O PROCESSO DE METACICLOGÊNESE *in vitro*

Padrão morfológico de parasitas selvagens (WT) ou com gene *Tcsti-1* parcialmente inativado (Mut), provenientes do sobrenadante das culturas após 24, 48, 72 e 96 horas de diferenciação observados ao microscópio de luz. A) forma epimastigota; B) forma tripomastigota metacíclica. A seta longa indica o núcleo e a seta curta indica o cinetoplasto. Barra=10µm.

Foram observadas várias alterações morfológicas nos parasitas mutantes presentes no sobrenadante das culturas, quando comparados com os parasitas selvagens, como condensação da cromatina e retração do citoplasma. Maiores detalhes sobre estas alterações deverão ser investigados através da observação desses parasitas por microscopia eletrônica.

5 DISCUSSÃO

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é um parasita que durante seu ciclo de vida está exposto a várias condições de estresse, tanto no hospedeiro invertebrado quanto no hospedeiro vertebrado. Entre as condições de estresse enfrentadas, pode-se destacar o estresse térmico a 37°C enfrentado quando o parasita passa do inseto vetor para o hospedeiro mamífero, o estresse nutricional ao qual o parasita é exposto no intestino do inseto, e o estresse causado pela exposição ao ambiente ácido tanto no inseto, quanto no fagolisossomo das células mamíferas. Embora a exposição a tais condições esteja envolvida nos processos de diferenciação que ocorrem ao longo do seu ciclo de vida, pouco se conhece sobre as proteínas de resposta ao estresse envolvidas nesses processos. A caracterização de tais elementos vem, deste modo, contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de diferenciação desse parasita.

A proteína Hop/STI-1 é uma co-chaperona que medeia a formação de um complexo entre HSP70 e HSP90 (SMITH *et al.*, 1993). Um estudo recente comparando 19 diferentes organismos eucarióticos mostrou que essa proteína foi a mais difundida entre as 10 co-chaperonas estudadas (JOHNSON & BROWN, 2009). Nossos estudos mostraram a ocorrência de uma proteína homóloga a Hop/STI-1 no protozoário *Trypanosoma cruzi* (TcSTI-1), confirmando assim a conservação dessa proteína em diversos eucariotos. Além disso, a proteína STI-1 de *T. cruzi* também apresenta os três domínios TPR característicos das co-chaperonas Hop/STI-1, nas porções N-terminal, Central e C-terminal, conforme se deduz da sua sequência de aminoácidos. Estes domínios TPR participam da formação do complexo multi-chaperona entre HSP70 e HSP90 (CHEN & SMITH, 1998; SCHEUFLER *et al.*, 2000).

A associação das proteínas TcSTI-1 e TcHSP70 foi demonstrada em formas epimastigotas de *T. cruzi* em crescimento exponencial, através dos ensaios de co-imunoprecipitação e imunolocalização, sugerindo que a proteína TcSTI-1 também possa atuar como uma proteína adaptadora na formação de complexos com chaperonas neste protozoário. Além desta associação, nossos resultados também indicaram que a proteína TcHSP70 é translocada para o núcleo quando os parasitas são submetidos a condições de estresse nutricional, semelhante ao observado quando os parasitas são incubados por duas horas a 37°C (MARTIN *et al.* 1993; OLSON *et al.* 1994).

O choque térmico e outras condições de estresse têm mostrado a indução da expressão de *sti-1* em vários organismos (NICOLET & CRAIG, 1989; LASSLE *et al.*, 1997; SONG *et al.*, 2009; HONORE *et al.*, 1992; HEINE *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2003). A indução da expressão de *Tcsti-1* em resposta a diferentes condições de estresse foi avaliada em formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento (Epi3d) incubadas em meio pobre em nutrientes, em meio ácido ou a 37°C por duas horas (estresse nutricional, de pH ou de temperatura, respectivamente). Contudo não foi verificada mudança significativa nos níveis protéicos de TcSTI-1 sob nenhuma das condições de estresse empregadas neste estudo. Um resultado semelhante foi obtido com estudos em camundongo e *Leishmania* sp., os quais não observaram mudanças nos níveis protéicos estacionários de STI-1 sob choque térmico, apesar de um aumento significativo nos níveis de RNAm (LASSLE *et al.*, 1997; WEEB *et al.*, 1997). Em *Leishmania* sp. foi possível verificar um aumento nos níveis protéicos de STI-1 somente a partir da marcação radioativa do meio de cultura e da observação dos níveis de STI-1 nascentes (WEEB *et al.*, 1997). Entretanto,

diferente do observado em leishmania e camundongo, os níveis de RNAm de *Tcsti-1* não modificaram nos parasitas submetidos ao estresse.

A avaliação da indução do gene *sti-1* por condições de estresse tem sido analisada através dos níveis de RNAm total em vários organismos (LASSLE *et al.*, 1997; SONG *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2003; WEEB *et al.*, 1997). Em *T. cruzi* optou-se por analisar somente a fração de RNAm associada a polissomos, porque a expressão gênica neste protozoário é regulada predominantemente em nível pós-transcricional (TEIXEIRA, 1998; CLAYTON, 2002). Os mecanismos envolvidos nessa regulação determinam o tempo de meia-vida do RNAm e seu acesso à maquinaria de tradução (SILVA *et al.*, 2006; GOLDENBERG *et al.*, 1985). A descrição recente de estruturas semelhantes a *P-bodies* em *T. cruzi* fornece mais evidências para a existência de vias regulatórias pós-transcricionais neste organismo (HOLETZ *et al.*, 2007). Estas estruturas consistem em locais onde moléculas de RNAm podem ser degradadas ou armazenadas no citoplasma. Apesar da análise da indução de *Tcsti-1* ter sido realizada a partir de RNAm associados à maquinaria de tradução, não foi observada a indução do gene em parasitas submetidos a nenhuma das condições de estresse, corroborando os resultados observados nos níveis protéicos. Portanto, pode-se inferir que as condições de estresse avaliadas não promovem a indução da expressão de STI-1 em *T. cruzi*.

Um fator que poderia influenciar na observação da indução de STI-1 seria o tempo de exposição das células às condições de estresse. Contudo, o período de duas horas sob condições de estresse utilizado neste estudo foi semelhante ao tempo de stress (em média), utilizado para estudos com outros organismos (levedura-30 min, camundongo-30 a 150 min, soja-120 min, leishmania-60 para 240 min), nos quais foi observada a indução de STI-1 nos níveis de RNAm e/ou proteína

(NICOLET & CRAIG, 1989, LÄSSLE *et al.*, 1997, ZHANG *et al.*, 2003, WEEB *et al.*, 1997). Outros ensaios foram realizados com períodos de exposição a condições de estresse de 4 e 6 horas, mas as análises por *Western blotting* não revelaram alterações nos níveis de TcSTI-1 (resultados não mostrados). Os níveis de TcHSP70 também não variaram de modo significativo nas diferentes condições de estresse analisadas, mesmo em períodos de exposição de 4 e 6 horas (resultados não mostrados). Contudo, a partir da observação da migração da TcHSP70 para o núcleo das formas epimastigotas sob estresse nutricional, podemos verificar que as condições de estudo foram capazes de provocar resposta ao estresse no parasita. Outros estudos de resposta ao estresse em epimastigotas em fase exponencial de crescimento mostram que o choque térmico provoca uma indução leve a acentuada de HSP70 (De CARVALHO *et al.*, 1990; REQUENA *et al.*, 1992; OLSON *et al.*, 1994). É possível que esta variabilidade observada na resposta ao estresse em *T. cruzi*, associada com a diversidade dos mecanismos de regulação gênica pós-transcricional presentes nesse organismo, possam explicar a ausência de indução de STI-1 em resposta ao estresse em células em fase exponencial de crescimento.

A proteína STI-1 parece ser mais que uma simples adaptadora molecular na formação de complexos com HSP70 e HSP90. Estudos realizados em camundongo mostraram que a STI-1 se liga à proteína príon celular (ZANATA *et al.*, 2002) e que esta interação medeia a sobrevivência e a diferenciação neuronal (LOPES *et al.*, 2005; ARANTES *et al.*, 2009). Visando aprofundar nossa compreensão da função da TcSTI-1 no ciclo de vida do *T. cruzi*, foram realizados estudos buscando outras proteínas parceiras da TcSTI-1, bem como a sua caracterização em outras formas do parasita, além de avaliar seu papel no processo de metaciclogênese.

Diversos testes de imunoprecipitação realizados neste trabalho, levaram a padronização do ensaio para identificação de outras proteínas que interagem *in vivo* com a TcSTI-1. Os ensaios de imunoprecipitação utilizaram extratos provenientes de formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento (Epi3d) e de formas epimastigotas em fase tardia de crescimento submetidas ao estresse nutricional que precede a metaciclogênese *in vitro* (Epi stress). O objetivo foi verificar se as proteínas associadas à TcSTI-1 nas formas em crescimento eram distintas daquelas nas formas preparadas para a diferenciação. Contudo, aguardamos a operacionalização do Espectrômetro de Massas (LC/MS/MS) recentemente instalado no instituto, para proceder à identificação das proteínas nas amostras obtidas nesses ensaios de imunoprecipitação.

A expressão de *Tcsti-1* avaliada por microarranjos de DNA não indicou indução de sua expressão nas formas epimastigota, tripomastigota metacíclica, tripomastigota e amastigota. Entretanto, foi observada modulação nos níveis protéicos nas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas (as formas tripomastigotas e amastigotas não foram avaliadas neste estudo). Análises proteômicas e por *Western blotting* demonstraram que ocorre um acúmulo de TcSTI-1 no parasita durante a fase de estresse nutricional que precede a diferenciação, bem como uma drástica diminuição de seus níveis protéicos nas forma tripomastigotas metacíclicas. Esta redução expressiva dos níveis de STI-1 durante a diferenciação deve estar relacionada à diminuição da capacidade de tradução (ATWOOD *et al.*, 2005) e a intensa degradação protéica que ocorre durante a metaciclogênese no parasita.

A modulação dos níveis de STI-1, em estudos não relacionados à resposta ao estresse, foi também observada recentemente durante o processo de embriogênese

em camundongo (HAJJ *et al.*, 2009). De modo semelhante ao observado neste organismo (LOPES *et al.*, 2005; ARANTES *et al.*, 2009), supomos que o acúmulo de TcSTI-1 durante o período de estresse nutricional talvez fosse importante para a sobrevivência do parasita ou até mesmo para promover o processo de diferenciação.

Paralelamente, as análises de imunolocalização mostraram a distribuição da TcSTI-1 por todo o citoplasma do parasita, de modo difuso e também em estruturas granulares, observadas em maior número e com maior intensidade ao redor do núcleo em epimastigotas em fase tardia de crescimento (Epi5d) e submetidos a estresse nutricional (Epi stress). Também foi observada a co-localização com TcHSP70 nas formas Epi5d e Epi stress, de modo preferencial em grânulos próximos ao núcleo, e sobreposição parcial dos grânulos em formas metacíclicas, sugerindo a interação dessas proteínas em outras formas do parasitas, além de epimastigotas em fase exponencial de crescimento (Epi3d).

Recentemente, a proteína STI-1/Hop foi encontrada em grânulos de estresse em células humanas, juntamente com outras co-chaperonas que se associam à HSP90 (PARE *et al.*, 2009). Os grânulos de estresse, assim como os *P-bodies*, são estruturas citoplasmáticas envolvidas no metabolismo de RNAm, sendo importantes centros de regulação pós-transcricional da expressão gênica (ANDERSON & KEDERSHA, 2006). Um outro trabalho desenvolvido por nosso grupo caracterizou a proteína Dhh1 em grânulos citoplasmáticos relacionados a *P-bodies* em *T. cruzi* (HOLETZ *et al.*, 2007). Esses dados, juntamente com as observações de padrão de distribuição granular da TcSTI-1 e sua associação com TcHSP70, levaram-nos a investigar a possível associação entre TcSTI-1 e TcDhh1 neste protozoário. Entretanto, os ensaios de imunolocalização não indicaram sobreposição dos

grânulos formados por ambas as proteínas, sugerindo que TcSTI-1 e TcDhh1 são componentes de estruturas granulares distintas em *T. cruzi*.

A fim de contribuir para o entendimento do papel da proteína STI-1 em *T. cruzi*, foi avaliada a capacidade de proliferação celular de parasitas com a expressão do gene *sti-1* bloqueada. As consequências da inativação de *sti-1* já foram investigadas em outros organismos. Longshaw e colaboradores (2008) verificaram, através de interferência de RNA em células tronco de camundongos, que o silenciamento de STI-1/Hop levou a perda de pluripotência, devido à diminuição da fosforilação e da translocação nuclear da proteína Stat3. Esta proteína atua como transdutora de sinal e ativadora da transcrição e os resultados obtidos sugerem que a proteína Hop possa participar de processos de sinalização envolvidos na pluripotência de células-tronco. Outro estudo realizado em leveduras (NICOLET & CRAIG, 1989) observou que a deleção de *sti-1* não afetou o crescimento entre 23 e 30°C, contudo a exposição à temperatura de 16 e 39°C inibiu a proliferação celular.

O silenciamento gênico em *T. brucei* e a avaliação de seu perfil de crescimento com a expressão do gene *sti-1* bloqueada foi uma das abordagens utilizadas neste trabalho. Este protozoário tem sido extensivamente utilizado em ensaios de silenciamento gênico em tripanossomatídeos, por possuir toda a maquinaria para promover interferência de RNA, diferente de outros protozoários como *T. cruzi* (WICKSTEAD *et al.*, 2002; Da ROCHA *et al.*, 2004). Além disso, este experimento foi viabilizado pela presença de um gene ortólogo a *sti-1* em *T. brucei*, denominado neste trabalho por *Tbsti-1*. Embora a caracterização deste gene e/ou de seu produto protéico ainda não tenha sido descrita na literatura, nós identificamos a presença de uma proteína, com massa molecular semelhante à calculada para

TbSTI-1, em extratos protéicos totais de *T. brucei* utilizando antissoro específico contra TcSTI-1. Devido à reação cruzada do antissoro com a proteína ortóloga de *T. brucei*, foi possível monitorar o bloqueio da expressão do gene *Tbsti-1* a partir da análise dos extratos protéicos por *Western blotting*. O bloqueio na expressão foi obtido a partir do segundo dia de indução de interferência de RNA e foi mantido até o último dia do ensaio (8º dia). Apesar do silenciamento bem sucedido de *Tbsti-1*, a ausência da respectiva proteína não interferiu na taxa de proliferação, bem como não alterou a morfologia do protozoário.

A outra metodologia empregada foi a inativação específica do gene *sti-1* de *T. cruzi* através de nocaute gênico. Neste trabalho foram construídos dois cassetes de DNA contendo genes que codificam proteínas que conferem resistência a antibiótico (higromicina ou G418), flanqueados por sequências intergênicas correspondentes a região a montante e a jusante da região codificadora de *Tcsti-1*. A inativação do gene foi efetuada através de recombinação homóloga. Todavia, somente a recombinação do cassete que confere resistência a higromicina foi bem sucedida, o que levou ao isolamento de uma linhagem de *T. cruzi* resistente ao referido antibiótico e portadora de uma inativação parcial do gene *Tcsti-1*. Esta linhagem mutante apresentou uma diminuição de quase 50% nos níveis da TcSTI-1, contudo esta redução não alterou a taxa de proliferação ou o padrão morfológico do parasita mutante avaliados durante 9 dias de cultivo em meio LIT. A taxa de mortalidade e o padrão de ciclo celular analisados por citometria de fluxo também não se mostraram alterados no parasita mutante em comparação à linhagem selvagem. Esses dados corroboram o resultado obtido com o bloqueio da expressão de *sti-1* em *T. brucei*. Além disso, indicam que a redução dos níveis da STI-1 não prejudica o crescimento, bem como não interfere na sobrevivência ou altera a morfologia do parasita em

condições normais de cultivo, semelhante ao fenótipo observado em levedura descrito anteriormente (NICOLET & CRAIG, 1989).

Os dados de acúmulo de STI-1 e a sua presença em grânulos citoplasmáticos nas formas epimastigotas submetidas ao estresse nutricional que precede o processo de diferenciação, levou-nos a avaliar se a TcSTI-1 teria algum papel no processo de diferenciação das formas epimastigotas para as formas tripomastiotas metacíclicas em *T. cruzi*, através do processo de metaciclogênese *in vitro*. A linhagem mutante (com gene *Tcsti-1* parcialmente inativo) apresentou menor capacidade de diferenciação do que a linhagem selvagem, com menor número e menor proporção de formas metacíclicas no sobrenadante das culturas em diferenciação, observado tanto nas contagens em câmara de Neubauer, quanto nas análises por citometria de fluxo. Isto indica que uma redução nos níveis de STI-1 parece dificultar o processo de diferenciação do parasita para a forma tripomastigota metacíclica.

Outro dado interessante foi o maior número de formas epimastigotas encontradas no sobrenadante das culturas da linhagem mutante após 96 horas de diferenciação, sugerindo que os parasitas aderidos à superfície das garrafas de cultura são liberados no sobrenadante sem completar o processo de diferenciação. É sabido que células em processo de diferenciação param de se dividir e permanecem na fase G1 do ciclo celular. Nossas análises do DNA nuclear por citometria de fluxo demonstraram que os parasitas mutantes aderidos às garrafas de cultura apresentam um pequeno aumento na proporção de células nas fases S+G2 em relação aos parasitas selvagens após 96 horas de diferenciação, refletindo, possivelmente, um menor comprometimento dos parasitas mutantes com o processo de diferenciação.

Esta menor taxa de diferenciação observada na linhagem mutante não parece estar relacionada à menor capacidade de sobrevivência do parasita em um meio com poucos nutrientes como o TAU3AAG empregado na metaciclogênese, visto que a taxa de mortalidade observada em parasitas mutantes aderidos às garrafas e no sobrenadante das culturas foi a mesma do que aquela observada na linhagem selvagem. Entretanto, foram observadas várias alterações morfológicas em parasitas mutantes do sobrenadante das culturas, como condensação da cromatina e retração do citoplasma. Maiores detalhes sobre estas alterações deverão ser investigados através da observação desses parasitas por microscopia eletrônica.

Alguns trabalhos do grupo da Dra. Vilma Martins (Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer) já haviam demonstrado a participação da STI-1 em processos de diferenciação de neurônios de camundongos, em associação à proteína príon celular (LOPES *et al.*, 2005; ARANTES *et al.*, 2009). Contudo, esta é a primeira descrição de evidência do envolvimento da proteína STI-1 em processos de diferenciação celular em eucariotos unicelulares.

O bloqueio da metaciclogênese em *T. cruzi* já foi descrito em outros trabalhos. Cardoso e colaboradores (2008) observaram que a inibição da atividade dos proteassomos através da droga lactacistina não impediu a adesão dos parasitas às garrafas de cultura durante a metaciclogênese, mas foi capaz de induzir alterações morfológicas nestas células e de impedir a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas. Em 2002 Graefe e colaboradores demonstraram a inibição da metaciclogênese utilizando geldamicina, uma droga que inibe a atividade da HSP90. As formas epimastigotas permaneceram na fase G1 do ciclo celular, mas não se diferenciaram em formas tripomastigotas metacíclicas.

Nossos resultados indicam que a proteína TcSTI-1 parece participar do disparo do processo de metaciclogênese. É possível que a proteína esteja exercendo um papel relevante em processos de sinalização intracelular. Em camundongo a interação da STI-1 com a proteína príon celular promove a neuroproteção e a neuritogênese tardia. Demonstrou-se que esta interação induz a ativação da proteína quinase A (PKA), da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e da quinase 1 e 2 reguladas por sinal extracelular (ERK1/2) (CHIARINI *et al.*, 2002; ZANATA *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2005). Esta hipótese pode ser reforçada pelos achados de acúmulo da proteína em epimastigotas em fase tardia de crescimento submetidos ao estresse nutricional imediatamente antes da diferenciação (Epi stress) e da dificuldade de diferenciação apresentada pelos parasitas mutantes com níveis reduzidos da proteína. Além disso, parece que para que ocorra a indução da expressão de TcSTI-1 é fundamental o aumento da densidade populacional durante o cultivo em meio LIT, visto que somente a diminuição de nutrientes no meio de cultura (stress nutricional em Epi3d) não foi suficiente para induzir sua expressão no parasita.

Também foi verificada maior formação de grânulos citoplasmáticos contendo STI-1 em Epi5d e Epi stress em regiões próximas ao núcleo e em associação com HSP70. Outra hipótese para explicar o papel da TcSTI-1 no disparo da metaciclogênese seria sua relação com o metabolismo citoplasmático de RNAm. Esta sugestão pode ser reforçada pela identificação recente da proteína STI-1/Hop em grânulos de estresse em células humanas em associação com HSP90. Como já exposto anteriormente, vários mecanismos de regulação gênica pós-transcricional devem operar em *T. cruzi*. O armazenamento e/ou a degradação seletiva de moléculas de RNAm em grânulos citoplasmáticos também poderiam estar

relacionados ao processo de diferenciação. Contudo, diferente dos grânulos de estresse, os grânulos contendo a TcSTI-1 foram observados tanto em presença quanto em ausência de estresse, embora o número de grânulos tenha aumentado nos parasitas submetidos ao estresse. Esta característica e a ausência da proteína Dhh1 nos grânulos contendo STI-1 sugerem a hipótese de que a proteína STI-1 possa constituir outro tipo de estrutura granular, não apresentando características exclusivas de grânulos de estresse ou de *P-bodies*, entretanto mais estudos devem ser realizados para confirmar esta sugestão.

6 CONCLUSÕES

A caracterização da proteína induzida pelo estresse (STI-1) de *Trypanosoma cruzi*, realizada a partir de diversas abordagens experimentais, permite-nos concluir que:

- A proteína STI-1 foi identificada nesse protozoário e, diferente do observado em outros organismos, a sua expressão não é induzida em formas epimastigotas em crescimento exponencial submetidas a duas horas de estresse nutricional, ou estresse em meio ácido ou estresse térmico à 37°C;
- A expressão da STI-1 é variável em diferentes formas do parasita no processo de metaciclogênese *in vitro*, a proteína é acumulada em epimastigotas em fase tardia de crescimento submetidos ao estresse nutricional que precede a diferenciação e degradada durante a diferenciação, permanecendo em baixos níveis nas formas tripomastigotas metacíclicas;
- A STI-1 é encontrada no citoplasma do parasita de forma difusa e também constituindo estruturas granulares, em associação com a HSP70 em locais próximos ao núcleo celular. Os grânulos aparecem em maior número em epimastigotas em fase tardia de crescimento e naqueles submetidos ao estresse nutricional antes da diferenciação. Porém, devem constituir grânulos citoplasmáticos distintos daqueles onde se localiza a proteína Dhh1 constituinte de *P-bodies* em *T. cruzi*;
- A associação entre STI-1 e HSP70 foi verificada em epimastigotas em crescimento exponencial, contudo a co-localização dessas proteínas sugere que essa associação também deve acontecer em outras formas do parasita;

- O crescimento celular em condições ideais não é afetado pelo bloqueio na expressão de *Tbsti-1* em *T. brucei*, assim como pela inativação parcial do gene ortólogo em *T. cruzi*;
- A proteína STI-1 é necessária em níveis adequados para que ocorra de modo eficiente a diferenciação *in vitro* de epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicas. Níveis reduzidos da STI-1 dificultam o processo de metaciclogênese *in vitro* de *T. cruzi*, gerando menor número de formas metacíclicas no sobrenadante das culturas e levando à modificações morfológicas em parasitas não diferenciados.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho abrem diversas perspectivas de estudo da função biológica da proteína STI-1 no ciclo de vida deste protozoário, dentre elas:

- Avaliar o fenótipo de *T. brucei* e *T. cruzi* com gene *sti-1* inativado frente a diferentes condições de estresse;
- Verificar o padrão de distribuição granular de STI-1 no citoplasma de *T. cruzi* frente às drogas cicloheximida e puromicina, comparado com parasitas com gene *sti-1* parcialmente inativado;
- Avaliar o fenótipo de parasitas com inativação completa do gene *Tcsti-1* e verificar o restabelecimento da capacidade de diferenciação por complementação genética;
- Identificar outras proteínas associadas à TcSTI-1 por espectrometria de massas;
- Avaliar a interação *in vitro* e *in vivo* da TcSTI-1 com as proteínas HSP70 e HSP90, a fim de verificar sua atuação na regulação da atividade destas chaperonas e sua possível relação com o processo de metaciclogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUZZI A, HEIKENWALDER M. Pathogenesis of prion diseases: Current status and future outlook. **Nat. Rev. Microbiol.**, 4:765–775, 2006.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, 215:403-10, 1990.

ANDERSON & KEDERSHA, 2006. RNA granules. **J. Cell Biol.**, 172(6):803-8, 2006.

ANDREWS, N.W., ABRAMS, C.K., SLATIN, S.L., GRIFFITHS, G. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, 61: 1277-87,1990.

ARANTES, C., NOMIZO, R., LOPES, M.H., HAJJ, G.N., LIMA, F.R., MARTINS, V.R. Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development. **Glia**, 57(13):1439-49, 2009.

ÁVILA, A.R., YAMADA-OGATTA, S.F., MONTEIRO, V.S., KRIEGER, M.A., NAKAMURA, C.V., DE SOUZA, W., GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 117: 169-177, 2001.

ÁVILA, A.R., DALLAGIOVANNA, B., YAMADA-OGATTA, S.F., MONTEIRO-GÓES, V., FRAGOSO, S.P., KRIEGER, M.A., GOLDENBERG, S. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Genet. Mol. Res.**, 2(1):159-68, 2003.

BARDWELL, J.C., CRAIG, E.A. Ancient heat shock gene is dispensable. **J. Bacteriol.** 170: 2977–2983, 1988.

BATISTA, M., MARCHINI, F.K., CELEDON, P.A.F., FRAGOSO, S.P., PROBST, C. M., PRETI, H., OZAKI, L. S., BUCK, G.A., GOLDENBERG, S., KRIEGER, M.A. A high-throughput cloning system for reverse genetics in trypanosomatids. . **BMC Microbiol.**, 10:259, 2010.

BLATCH, G.L., LÄSSLE, M., ZETTER, B.R., KUNDRA, V. Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif. **Gene.**, 194(2):277-82, 1997.

BLUM, H., et al. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8:93–99, 1987.

BONALDO, M.C., SOUTO-PADRON, T., DE SOUZA, W., AND GOLDENBERG, S.. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **J. Cell. Biol.**,106: 1349-1358, 1988.

BOORSTEIN, W.R., ZIEGELHOFFER, T., CRAIG, E.A. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. **J. Mol. Evol.**, 38: 1–17, 1994.

- BRENER, Z., ANDRADE, Z., BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas***. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1979.
- BRINGAUD, F., PEYRUCHAUD, S., BALTZ, D., GIROUD, C., SIMPSON, L., BALTZ, T. Molecular characterization of the mitochondrial heat shock protein 60 gene from *Trypanosoma brucei*. **Molec. Biochem. Parasitol.**, 74: 119-123, 1995.
- BRINKER, A., SCHEUFLE, C., VON DER, M. F., FLECKENSTEIN, B., HERRMANN, C., JUNG, G. Ligand discrimination by TPR domains. Relevance and selectivity of EEVD-recognition in Hsp70×Hop×Hsp90 complexes. **J. Biol. Chem.**, 277: 19265–19275, 2002.
- BROWN, M.A.; ZHU, L.; SCHMIDT, C.; TUCKER, P.W. Hsp90—from signal transduction to cell transformation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 363: 241–246, 2007.
- BURCHMORE, R.J., BARRETT, M.P. Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania amastigotes*. **Int. J. Parasitol.**, 31(12):1311-20, 2001.
- CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: I. Origin of metacyclic trypomastigotes in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop.**, 6: 93-100, 1964.
- CANO, M.I., GRUBER, A., VAZQUEZ, M. et al. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 71: 273-278, 1995.
- CARDOSO, J., SOARES, M.J., MENNA-BARRETO, R.F.S., LE BLOAS, R., SOTOMAIOR, V.S., GOLDENBERG, S., KRIEGER, M.A. Inhibition of proteasome activity blocks *Trypanosoma cruzi* growth and metacyclogenesis. **Parasitol. Res.**, 103: 941-951, 2008.
- CARRIGAN, P. E., NELSON, G. M., ROBERTS, P. J., STOFFER, J., RIGGS, D. L. AND SMITH, D. F. Multiple domains of the co-chaperone Hop are important for Hsp70 binding. **J. Biol. Chem.**, 279: 16185–16193, 2004.
- CARRIGAN, P. E., RIGGS, D. L., CHINKERS, M.; SMITH, D. F. Functional comparison of human and *Drosophila* Hop reveals novel role in steroid receptor maturation. **J. Biol. Chem.** 280: 8906–8911, 2005.
- CARVALHO, T.M., de SOUZA, W. Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. **Cell Struct. Funct.**, 14: 383-92, 1989.
- CELIS, J.E., DEJGAARD, K., MADSEN, P., LEFFERS, H., GESSER, B., HONORÉ, B., RASMUSSEN, H.H., OLSEN, E., LAURIDSEN, J. B., RATZ, G., MOURITZEN, S., BASSE, B., HELLERUP, M., CELIS, A., PUYPE, M., VAN DAMME, J. VANDEKERCKHOVE, J. The MRC-5 human embryonal lung fibroblast two-dimensional gel cellular protein database: Quantitative identification of polypeptides whose relative abundance differs between quiescent, proliferating and SV 40 transformed cells. **Electrophoresis**, 11: 1072-1113, 1990.

- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 1: 159-218, 1909.
- CHANG, H.C., NATHAN, D.F., LINDQUIST, S. In vivo analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60). **Mol. Cell Biol.**, 17(1): 318–325, 1997.
- CHEN, S., V. PRAPAPANICH, R. A. RIMERMAN, B. HONORE, AND D. SMITH. Interactions of p60, a mediator of progesterone receptor assembly, with heat shock proteins Hsp90 and Hsp70. **Mol. Endocrinol.**, 10(6):682–693, 1996.
- CHEN, S., SMITH, D.F. Hop as an Adaptor in the Heat Shock Protein 70 (Hsp70) and Hsp90 Chaperone Machinery. **J. Biol. Chem.**, 273(52): 35194-35200, 1998.
- CHEUNG, V.G., MORLEY, M., AGUILAR, F., MASSIMI, A., KUCHERLAPATI, R., CHILDS, G. Making and Reading Microarrays. **Nature Genetics**, 21:15-19, 1999.
- CHIARINI, L. B., FREITAS, A. R., ZANATA, S. M., BRENTANI, R. R., MARTINS, V. R., LINDEN R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO J.**, 21: 3317–3326, 2002.
- CLAYTON, C.E. Genetic manipulation of *Kinetoplastida*. **Parasitol. Today**, 15: 372-378, 1999.
- CLAYTON, C.E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again, **EMBO J.** 21: 1881–1888, 2002.
- CONTRERAS, V.T., SALLES, J.M., THOMAS, N., MOREL, C.M., GOLDENBERG, S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 16: 315-327, 1985a.
- CONTRERAS, V.T., MOREL, C.M., GOLDENBERG, S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, (1):83-96, 1985b.
- CONTRERAS, V.T., ARAUJO-JORGE, T.C., BONALDO, M.C., THOMAS, N., BARBOSA, H.S., MEIRELLES, M.N.L., GOLDENBERG, S. Biological aspects of the Dm28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 83: 123-133, 1988.
- CORNELISSEN, A.W., EVERS, R., GRONDAL, E.J., HAMMER, A., JESS, W., KOCK, J. Transcription and RNA polymerases in *Trypanosoma brucei*. **Acta Leiden**, 58: 75-96, 1989.
- CORNELISSEN, A.W., BACKES, S., EVERS, R., GRONDAL, E.J., JESS, W., KOCK, J. Transcription analysis in *Trypanosoma brucei*. **Biochem. Soc. Trans.**, 18: 710-714, 1990.
- COURA, J.R., JUNQUEIRA, A.C., BOIA, M.N., FERNANDES, O., BONFANTE, C., CAMPOS, J.E., SANTOS, L., DEVERA, R. Chagas disease in the Brazilian Amazon: IV. a new cross-sectional study. **Rev. Inst. Med. Trop.**, 44:159-65, 2002.

COX, F. E. G. History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, v. 18, p. 231-245, 2004.

Da ROCHA, W. D., OTSU, K., TEIXEIRA, S. M. R., DONELSON, J.E. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 133 (2):175-86, 2004.

Da SILVA, R.A., BARTHOLOMEU, D.C., TEIXEIRA, S.M. Control mechanisms of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Parasitol.** 36: 87–96, 2006.

DALLAGIOVANNA, B., PLAZANET-MENUT, C., OGATTA, S.F., ÁVILA, A.R., KRIEGER, M.A., GOLDENBERG, S. *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. **Exp. Parasitol.**; 99(1):7-16, 2001.

DANIEL, S., BRADLEY, G., LONGSHAW, V.M., SÖTI, C., CSERMELY, P., BLATCH, G.L. Nuclear translocation of the phosphoprotein Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein) occurs under heat shock, and its proposed nuclear localization signal is involved in Hsp90 binding. **Biochem. Biophys. Acta**, 83(6):1003-14, 2008.

De ANDRADE, A.F., ESTEVES, M.J., ANGLUSTER, J., GONZALES-PERDOMO, M., GOLDENBERG, S. Changes in cell-surface carbohydrates of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis under chemically defined conditions. **J. Gen. Microbiol.**, 137: 2845-9, 1991.

De CARVALHO, E.F., DE CASTRO, F.T., RONDINELLI, E., SOARES, C.M., CARVALHO, J.F. HSP 70 gene expression in *Trypanosoma cruzi* is regulated at different levels. **J. Cell Physiol.**, 143(3):439-44, 1990.

De CARVALHO, E.F., DE CASTRO, F.T., RONDINELLI, E., CARVALHO, J.F. Physiological aspects of *Trypanosoma cruzi* gene regulation during heat-shock. **Biol Res.**, 27(3-4):225-31, 1994.

De SOUZA W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Ver. Citol.**, 86:197-283, 1984.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Pharm. Design**, 8: 269-285, 2002.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. Em: BRENER, Z.; ANDRADE Z.A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DIAS, JCP. Mecanismos de transmissão. Em: BRENER, Z.; ANDRADE Z.A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979.

DIETRICH, P., SOARES, M.B., AFFONSO, M.H., FLOETER-WINTER, L.M. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. **Gene**, 125: 103-107, 1993.

DITTMAR, K. D., K. A. HUTCHISON, J. K. OWENS-GRILLO, AND W. B. PRATT. Reconstitution of the steroid receptor hsp90 heterocomplex assembly system of rabbit reticulocyte lysate. **J. Biol. Chem.** 271:12833–12839, 1996.

DRAGON, E. A. , SIAS, S. R. , KATO, E. A. & GABE, J. D. The genome of *Trypanosoma cruzi* contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. **Mol. Cell Biol.**, 7: 1271-1275, 1987.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A. N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E. A.; DELCHER, A. L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S. J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G. C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D. A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; DA SILVEIRA, J. F.; DE JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P. T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A. C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M. J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C. R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J. C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J. L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, D. O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A. J.; SISK, E.; TAMMI, M. T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; VAN AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P. N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; STUART, K. D.; ANDERSSON, B. **The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease.** Science 309(5733): 409-415, 2005.

EISEN M,B.; SPELLMAN, P.T.; BROWN, P.O. & BOTSTEIN, D.. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 25: 14863-14868, 1998.

ELIAS, M.C.; MARQUES-PORTO, R.; FREYMULLER, E.; SCHENKMAN, S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 112: 79-90, 2001.

ELLIS, R.J. Protein misassembly: macromolecular crowding and molecular chaperones. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 594: 1–13, 2007.

ESTEVEZ, M.G., GONZALES-PERDOMO, M., SALVIANO, C.S., ANGLUSTER, J., GOLDENBERG, S. Changes in fatty acid composition associated with differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 50(1-2):31-34, 1989.

FEDER, M.E., HOFMANN, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annu. Rev. Physiol.**, 61:243-82, 1996.

FIGUEIREDO, R.C.B.Q., ROSA, D.S., SOARES, M.J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. **J. Parasitol.**, 86(6):1213-1218, 2000.

FINN, R.D.; TATE, J.; MISTRY, J.; COGGILL, P.C.; SAMMUT, J.S.; HOTZ, H.R.; CERIC, G.; FORSLUND, K.; EDDY, S.R.; SONNHAMMER, E.L.; BATEMAN, A.. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research** 36:D281-D288, 2008.

FLOM G, BEHAL RH, ROSEN L, COLE DG, JOHNSON JL. Definition of the minimal fragments of Sti1 required for dimerization, interaction with Hsp70 and Hsp90 and in vivo functions. **Biochem J.** May 15;404(1):159-67, 2007.

FOLGUEIRA, C., REQUENA, J.M. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. **FEMS Microbiol. Rev.**, 31: 359-377, 2007.

FRAGOSO, S.P.; PLAZANET-MENUT, C.; CARREIRA, M.A.; MOTTA, M.C.; DALLAGIOVANA, B.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of a gene encoding a putative protein associated with U3 small nucleolar ribonucleoprotein in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 126: 113-117, 2003.

GAISER, A. M., BRANDT, F., AND RICHTER, K. The non-canonical hop protein from *Caenorhabditis elegans* exerts essential functions and forms binary complexes with either Hsc70 or Hsp90. **J. Mol. Biol.** 391: 621-634, 2009.

GARCIA, E.S., GONZALEZ, M.S., DE AZAMBUJA, P., BARALLE, F.E., FRAIDENRAICH, D., TORRES, H.N., AND FLAWIA, M.M.. Induction of *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis in the gut of the hematophagous insect vector, *Rhodnius prolixus*, by hemoglobin and peptides carrying alpha D-globin sequences. **Exp. Parasitol.**, 81, 255-61, 1995.

GERTHOFFER, W.T.; GUNST, S.J. Invited review: focal adhesion and small heat shock proteins in the regulation of actin remodeling and contractility in smooth muscle. **J. Appl. Physiol.**, 91: 963–972, 2001

GIAMBIAGI DE MARVAL, M., GOTTESDIENER, K., RONDINELLI, E., VAN DER PLOEG, L.H. Predicted amino acid sequence and genomic organization of *Trypanosoma cruzi* hsp 60 genes. **Mol Biochem Parasitol**, 58: 25–31, 1993.

GLICKMAN, M. H. & CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. **Physiological Reviews**. 82: 373–428, 2002.

GOLDENBERG, S., CONTRERAS, V.T., SALLES, J.M., BONALDO, M.C., LIMA FRANCO, M.P.A., LINSS, J., LAFAILLE, J., VALLE, D., MOREL, C.M. Facts and hypothesis on *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 79 (suppl): 39-44, 1984.

GOLDENBERG, S., SALLES, J.M., CONTRERAS, V.T., LIMA-FRANCO, M.P.A., KATZIN, A.M., COLLI, W., MOREL, C. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, **FEBS Lett.** 180: 265–270, 1985.

- GOLDENBERG, S.. *Trypanosoma cruzi* as a model system for studying cell differentiation. **Parasites: Molecular Biology, Drug and Vaccine Design**, 1-6, 1990.
- GONZALES-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENBERG, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Exp. Parasitol.**, 66: 205-212, 1988.
- GRAEFE, S.E.B., WIESGIGL, M., GAWORSKI, I., MACDONALD, A., CLOS, J. Inhibition of hsp90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation. **Eukariotic Cell**, 1(6):936–943, 2002.
- GROSS, M., HESSEFORT, S. Purification and characterization of a 66-kDa protein from rabbit reticulocyte lysate which promotes the recycling of Hsp. **J. Biol. Chem.**, 271: 16833-16841, 1996.
- HAIJ, G.N., SANTOS, T.G., COOK, Z.S., MARTINS, V.R. Developmental expression of prion protein and its ligands stress-inducible protein 1 and vitronectin. **J. Comp. Neurol.**, 517(3):371-84, 2009.
- HARTL, F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, 381: 571–579, 1996.
- HEINE H, DELUDE RL, MONKS BG, ESPEVIK T, GOLENBOCK DT. Bacterial lipopolysaccharide induces expression of the stress response genes hop and H411. **J. Bio. Chem.**, 274(30):21049-55, 1999.
- HERNÁNDEZ TORRES, J., CHATELLARD, P., STUTZ, E. Isolation and characterization of gmsti, a stress-inducible gene from soybean (*Glycine max*) coding for a protein belonging to the TPR (tetratricopeptide repeats) family. **Plant Mol. Biol.**, 27(6):1221-6, 1995.
- HERNANDEZ, M. P., SULLIVAN, W. P. & TOFT, D. O. The assembly and intermolecular properties of the hsp70–Hop–hsp90 molecular chaperone complex. **J. Biol. Chem.**, 277: 38294–38304, 2002.
- HIGHTOWER, L.E. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. **Cell**, 66: 191–197, 1991.
- HOLETZ, F.B., CORREA, A., AVILA, A.R., NAKAMURA, C.V., KRIEGER, M.A., GOLDENBERG, S. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Biophys Res Commun**. 356(4):1062-7, 2007.
- HONORÉ, B., LEFFERS, H., MADSEN, P., RASMUSSEN, H.H., VANDEKERCKHOVE, J., CELIS, J.E. Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. **J. Biol. Chem.**, 267(12):8485-91, 1992.
- HU, J., TOFT, D., ANSELMO, D., WANG, X. *In vitro* reconstitution of functional hepatitis virus reverse transcriptase with cellular chaperone proteins. **J. Virol.** 76:269–279, 2002.

- JOHNSON, B.D., SCHUMACHER, R.J., ROSS, E.D., TOFT, D.O. Hop Modulates hsp70/hsp90 Interactions in Protein Folding. **J. Biol. Chem.**, 273: 3679–3686, 1998.
- JOHNSON, J.L., BROWN, C. Plasticity of the Hsp90 chaperone machine in divergent eukaryotic organisms. **Cell Stress Chaperones**, 14(1):83-94, 2009.
- KAMAL, A., BOEHM, M.F., BURROWS, F.J. Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation. **Trends Mol. Med.**, 10: 283–290, 2004.
- KEDERSHA, N., STOECKLIN, G., AYODELE, M., YACONO, P., LYKKE-ANDERSEN, J., FRITZLER, M., SCHEUNER, D., KAUFMAN, R., GOLAN, D.E., ANDERSON, P. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. **J. Cell Biol.** 169:871–884, 2005.
- KOCK, J.; CORNELISSEN, A.W. Characterization of the RNA polymerases of *Crithidia fasciculata*. **Mol. Microbiol.**, 5: 835-842, 1991.
- KOLLIEN, A.H., SCHAUB, G.A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitol. Today**, 16:381-7, 2000.
- KRASSNER, S.M., GRANGER, B., LEE, P., GUERRA, C., LE, T., LUC, K.O. Action of exogenous potassium and calcium ions on *in vitro* metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. **J. Protozool.**, 38(6):602-608, 1991.
- KRIEGER, M.A., GOLDENBERG, S. Representation of differential expression: A new approach to study differential gene expression in trypanosomatids. **Parasitol. Today**, 14(4): 163-166, 1998.
- KRIEGER, M.A.; ÁVILA, A.R.; OGATTA, S.F.; PLAZANET-MENUT, C & GOLDENBERG, S.. Differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* Metacyclogenesis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94 supl 1: 165-168, 1999.
- KWON, A.R.; TRAME, C.B.; MCKAY, D.B. Kinetics of protein substrate degradation by HslUV. **J. Struct. Biol.**, 146: 141–147, 2004.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680 – 683, 1970.
- LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., HIGGINS, D.G. ClustalW and ClustalX version 2. **Bioinformatics**, 23(21): 2947-2948, 2008.
- LÄSSLE, M., BLATCH, G.L., KUNDRA, V., TAKATORI, T., ZETTER, B.R. Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and *in vitro* phosphorylation by different kinases. **J. Biol. Chem.**, 272(3):1876-84, 1997.
- LEBOWITZ, J.H.; SMITH, H.Q.; RUSCHE, L.; BEVERLEY, S.M. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Genes Develop.**, 7: 996-1007, 1993.

- LEE, M.G.; ATKINSON, B.L.; GIANNINI, S.H.; VAN DER PLOEG, L.H. Structure and expression of the hsp 70 gene family of *Leishmania major*. **Nucleic Acids Res.** 16(20):9567-85, 1988.
- LEVINE, N.D, CORLISS, J.O, COX, F.E.G, DEROUX, G, GRAIN, J, HONIGBERG, B.M, LEEDADE, G.F, LOEBLICH, A.R, LOM, F, LYNN, D, MERINFELD, E.G, PAGE, F.C, POLJANSKY, G, SPRAGUE, V, VAVRA, J. e WALLACE, F.G. A newly revised classification of the Protozoa. **J. Protozool.** 1980; 27:37-58.
- LONGSHAW, V.M., CHAPPLE, J.P., BALDA, M.S., CHEETHAM, M.E., BLATCH, G.L. Nuclear translocation of the Hsp70/Hsp90 organizing protein mSTI1 is regulated by cell cycle kinases, **J. Cell. Sci.** 117: 701–710, 2004.
- LOPES, M.H., HAJJ, G.N., MURAS, A.G., MANCINI, G.L., CASTRO, R.M., RIBEIRO, K.C., BRENTANI, R.R., LINDEN, R., MARTINS, V.R. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways, **J. Neurosci.** 25:11330–11339, 2005.
- LOUW, C.A., LUDEWIG M.H., MAYER J., BLATCH G.L. The Hsp70 chaperones of the Trityps are characterized by unusual features and novel members. **Parasitol. Int.**, 59(4):497-505, 2010.
- LU, H.Y. & BUCK, G.A.. Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 44: 109-114, 1991.
- MAGDALENO, A., AHN I-Y, PAES, L.S., SILBER, A.M. Actions of a Proline Analogue, L-Thiazolidine-4-Carboxylic Acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, 4: 4534, 2009.
- MAIR, G.; SHI, H.; LI, H.; DJIKENG, A.; AVILES, H.O.; BISHOP, J.R.; FALCONE, F.H.; GAVRILESCU, C.; MONTGOMERY, J.L.; SANTORI, M.I.; STERN, L.S.; WANG, Z.; ULLU, E.; TSCHUDI, C. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of premRNA. **RNA**, 6: 163-169, 2000.
- MARESCA, B.; CARRATU, L. The biology of the heat shock response in parasites. **Parasitol. Today**, 8: 260–266, 1992.
- MARTIN, F., REQUENA, J.M., MARTIN, J., ALONSO, C., LÓPEZ, M.C. Cytoplasmic-nuclear translocation of the Hsp70 protein during environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Biophys Res Commun.**, 196(3):1155-62, 1993.
- MAYER, M.P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cell. Mol. Life Sci.**, 62: 670–684, 2005.
- McCARTHY-BURKE, C.; TAYLOR, Z.A.; BUCK, G.A. Characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, 82: 177-189, 1989.
- McLAUGHLIN, S. H., SMITH, H. W. & JACKSON, S. E. Stimulation of the weak ATPase activity of human hsp90 by a client protein. **J. Mol. Biol.**, 315: 787–798, 2002.

- MEDINA-ACOSTA, E.; CROSS, G.A.M. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple mini-prep procedure. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 59:327-330, 1993.
- MOFFETT, L.K., STEFAN, H., KENNETH, D.S. RNA editing: getting U into RNA. **TIBS.**, 22: 162-166, 1997.
- MONTEIRO-GÓES, V. **Análise genômica funcional do *Trypanosoma cruzi* submetido a diferentes tipos de estresses**. Curitiba, 2008. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz.
- MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCIA, P. & VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 54(5): 1861-1875, 2004.
- MORISHIMA, Y., KANELAKIS, K. C., SILVERSTEIN, A. M., DITTMAR, K. D., ESTRADA, L., PRATT, W. B. The Hsp Organizer Protein Hop Enhances the Rate of but Is Not Essential for Glucocorticoid Receptor Folding by the Multiprotein Hsp90-based Chaperone System. **J. Biol. Chem.**, 275(10): 6894 – 6900, 2000.
- MOTTRAM, J.C., MURPHY, W.J., AGABIAN, N. A transcriptional analysis of the *Trypanosoma brucei* hsp83 gene cluster. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 37: 115–128, 1989.
- MUTOMBA, M.C.; TO, W.Y.; HYUN, W.C.; WANG, C.C; Inhibition of proteasome activity blocks cell cycle progression at specific phase boundaries in African trypanosomes. **Mol Biochem Parasitol.** 90:491-504, 1997.
- NARDELLI, S.C., AVILA, A.R., FREUND, A., MOTTA, M.C., MANHÃES, L., DE JESUS, T.C., SCHENKMAN, S., FRAGOSO, S.P., KRIEGER, M.A., GOLDENBERG, S., DALLAGIOVANNA, B. Small-subunit rRNA processome proteins are translationally regulated during differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Eukaryot Cell.**, 6(2):337-45, 2007.
- NICOLET, C.M., CRAIG, E.A. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell Biol.**, (9):3638-46, 1989.
- NILSEN, T.W. Trans-splicing in protozoa and helminths. **Infect. Agents and Diseases**, 1: 212-218, 1992.
- NOGUEIRA N, BIANCO C, COHN Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.**, 142:225-229, 1975.
- NOLAN, D.P., ROLIN, S., RODRIGUEZ, J.R., ABBEELE, J.V.D., PAYS, E. Slender and stumpy bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* display a differential response to extracellular acidic and proteolytic stress. **Eur. J. Biochem.**, 267:18-27, 2000.
- NUNES, L.R.; CARVALHO, M.R.; SHAKARIAN, A.M.; BUCK, G.A. The transcription promoter of the spliced leader gene from *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, 188: 157-168, 1997.

- ODUNUGA, O.O., LONGSHAW, V.M., BLATCH, G.L. Hop: more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. **Bioessays**, 10:1058-68, 2004.
- OLSON, C.L., NADEAU, K.C., SULLIVAN, M.A., WINQUIST, A.G., DONELSON, J.E., WALSH, C.T., ENGMAN, D.M. Molecular and biochemical comparison of the 70-kDa heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, 269(5):3868-74, 1994.
- ONUOHA, S. C., COULSTOCK, E. T., GROSSMANN, J. G., JACKSON, S. E. Structural Studies on the Co-chaperone Hop and Its Complexes with Hsp90. **J. Mol. Biol.**, 379: 732–744, 2008.
- PALMER, G., LOUVION, J.F., TIBBETTS, R.S., ENGMAN, D.M., PICARD, D. *Trypanosoma cruzi* heat-shock protein 90 can functionally complement yeast. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 70: 199–202, 1995.
- PARE, J. M.; TAHBAZ, N.; LOPEZ-OROZCO, J.; LAPOINTE, P.; LASKO, P.; HOBMAN, T.C. Hsp90 regulates the function of argonaute 2 and its recruitment to stress granules and P-bodies. **Mol. Biol. Cell.**, 20: 3273-3284, 2009.
- PARSONS, M., WORTHEY, E. A., WARD, P. N., AND MOTTRAM, J. C. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, 6: 127-145, 2005.
- PEARL, L.H.; PRODROMOU, C. Structure and mechanism of the hsp90 molecular chaperone machinery. **Annu. Rev. Biochem.**, 75:271–94, 2006.
- PISCOPO T. V.; AZZOPARDI C. M. Leishmaniasis. **Postgrad. Med. J.**, v. 82, p. 649-657, 2006.
- PRATT, W.B., TOFT, D.O. Regulation of Signaling Protein Function and Trafficking by the hsp90/hsp70-Based Chaperone Machinery. **Exp. Biol. Med.**, 228(2): 111 – 133, 2003.
- PRODROMOU, C., SILIGARDI, G., O'BRIEN, R., WOOLFSON, D. N., REGAN, L., PANARETOU, B., LADBURY, J. E., PIPER, P. W. AND PEARL, L. H. Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. **EMBO J.**, 18: 754–762, 1999.
- RANSON N.A.; CLARE, D.K.; FARR, G.W.; HOULDERSHAW, D.; HORWICH, A.L.; SAIBIL, H.R. Allosteric signaling of ATP hydrolysis in GroEL–GroES complexes. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, 13: 147–152, 2006.
- REQUENA, J.M., JIMENEZ-RUIZ, A., SOTO, M., ASSIEGO, R., SANTARÉN, J.F., LOPEZ, M.C., PATARROYO, M.E., ALONSO C. Regulation of hsp70 expression in *Trypanosoma cruzi* by temperature and growth phase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 53:201-11, 1992.
- RICHTER, K., MUSCHLER, P., HAINZL, O., REINSTEIN, J. BUCHNER, J. Sti1 is a non-competitive inhibitor of the Hsp90 ATPase. Binding prevents the N-terminal

- dimerization reaction during the ATPase cycle. **J. Biol. Chem.**, 278: 10328–10333, 2003.
- RITOSSA, F.A. A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experimentia**, 18: 571–573, 1962.
- RITOSSA, F. Discovery of the heat shock response. **Cell Stress Chaperon.**, 1: 97–98, 1996.
- ROLIN S, HANOCQ-QUERTIER J, PATURIAUX-HANOCQ F, NOLAN DP, PAYS E. Mild acid stress as a differentiation trigger in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 93:251–262, 1998.
- SHAPIRA, M., PEDRAZA, G. Sequence analysis and transcriptional activation of heat shock protein 83 of *Leishmania mexicana amazonensis*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 42: 247–256, 1990.
- SHAPIRO, T.A.E.; ENGLUND, P.T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annu. Ver. Microbiol.**, 49: 117-143, 1995.
- SCHAUB, G.A., KLEFFMANN, T., KOLLIEN, A.H., SCHMIDT, J. Hydrophobic attachment of *Trypanosoma cruzi* to the rectal cuticle of *Triatoma infestans* and its influence on metacyclogenesis - a review. **Tokai J. Exp. Clin. Med.**, (6):321-7, 1998.
- SCHEUFELER, C., BRINKER, A., BOURENKOV, G., PEGORARO, S., MORODER, L., BARTUNIK, H., HARTL, F.U., MOAREFI, I. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. **Cell.**, 101(2):199-210, 2000.
- SCHIRMER, E.C.; GLOVER, J.R.; SINGER, M.A.; LINDQUIST, S. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. **Trends Biochem. Sci.**, 21: 289–296, 1996.
- SCHMUNIS, G.A. Tripanossomíase americana: Seu impacto nas Américas e perspectivas de eliminação. Em: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R.. **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: Uma Abordagem para o Clínico Geral**. 20 ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. Cap 1, p.11-24.
- SCHMUNIS, G.A. A Tripanossomíase Americana e seu Impacto na Saúde Pública das Américas. Em: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M.. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap 1, p.1-12.
- SCHWARTZ, D., CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulse field gradient gel electrophoresis. **Cell**. 37: 67-75, 1984.
- SHERLOCK, I.A. Vetores. Em: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M.. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap 3, p.21-40.
- SMITH, D. & TOFT, D. Steroid receptors and their associated proteins. **J. Mol. Endocrinol.**, 7: 4–11, 1993.

- SMITH, D.F., SULLIVAN, W.P., MARION, T.N., ZAITSU, K., MADDEN, B., MCCORMICK, D.J., TOFT, D.O. Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. **Mol. Cell Biol.**, 13:869–876, 1993.
- SONG, H. O., LEE, W., AN, K., LEE, H. S., CHO, J. H., PARK, Z. Y., AHNN, J. C. *C. elegans* STI-1, the homolog of Sti1/Hop, is involved in aging and stress response. **J. Mol. Biol.**, 390: 604-617, 2009.
- SVS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota Técnica. **Doença de Chagas Aguda Relacionada à Ingestão de Caldo de Cana em Santa Catarina.** 2005.
- TEIXEIRA, S.M. Control of gene expression in Trypanosomatidae. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31: 1503–1516, 1998.
- THOMAS, M. C., GONZÁLEZ, A. A transformation vector for stage-specific expression of heterologous genes in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitol. Res.**, 83: 151-156, 1997.
- TISSIER, A.; MITCHELL, H.K.; TRACY, U.M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. **J. Mol. Biol.**, 84: 389–398, 1974.
- TOMLINSON, S, VANDEKERCKHOVE, F, FREVERT, U, NUSSENZWEIG, V. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. **Parasitology**, 110:547-554, 1995.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 76: 4350-4, 1979.
- TYLER, K.M., ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int. J. Parasitol.**, 2001; 31: 472-81.
- VANHAMME, L.; PAYS, E. Control of gene expression in trypanosomes. **Microbiol. Rev.**, 59: 223-240, 1995.
- VAN DER PLOEG, L.H., GIANNINI, S.H., CANTOR, C.R. Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. **Science**, 228: 1443-1446, 1985.
- VAN MONTFORT, R.; SLINGSBY, C.; VIERLING, E. Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. **Adv. Protein Chem.**, 59: 105–156, 2001.
- VICKERMAN, K.; TETLEY, L. Recent structural studies on trypanosomes. **Ann. Soc. Belg. Med. Trop.**, 57: 441-457, 1977.
- WANG, Z., J. C. MORRIS, M. E. DREW, AND P. T. ENGLUND. Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. **J. Biol. Chem.** 275:40174-40179, 2000.

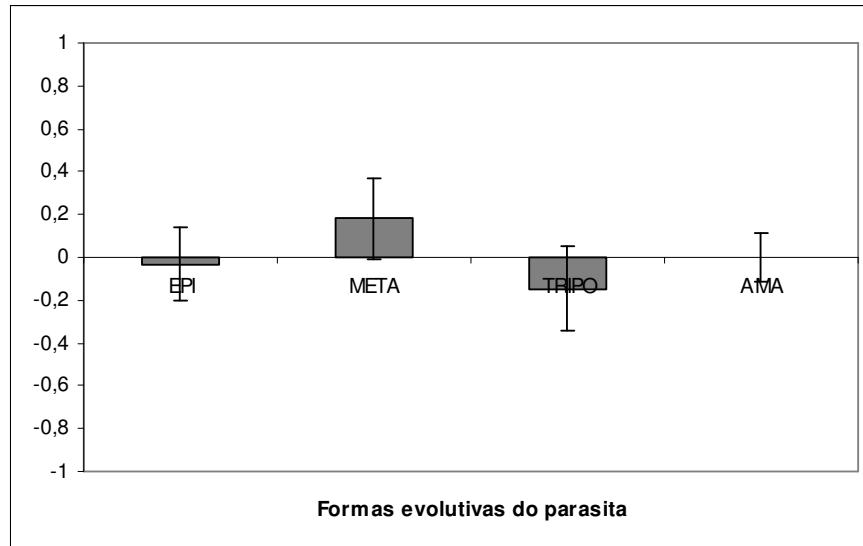
- WAWRZYNOW, A.; BANECKI, B.; ZYLICZ, M. The Clp ATPases define a novel class of molecular chaperones. **Mol. Microbiol.**, 21: 895–899, 1996. WEBB, J.R., CAMPOS-NETO, A., SKEIKY, Y.A.W., REED, S.G., Molecular characterization of the heat-inducible LmSTI1 protein of *Leishmania major*, **Mol. Biochem. Parasitol.** 89: 179–193, 1997.
- WEGELE, H., HASLBECK, M., REINSTEIN, J. AND BUCHNER, J. Sti1 is a novel activator of the Ssa proteins. **J. Biol. Chem.**, 278: 25970–25976, 2003.
- WELCH, W.J. The role of heat-shock proteins as molecular chaperones. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 3: 1033–1038, 1991.
- WELCH, W.J., FERAMISCO, J.R. Purification of the major mammalian heat shock proteins. **J. Biol. Chem.**, 257: 14949–14959, 1982.
- WESTERHEIDE, S.D., MORIMOTO, R.I. Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. **J. Biol. Chem.**, 280: 33097–33100, 2005.
- WICKSTEAD, B., ERSFELD, K., GULL, K. Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 125:211-216, 2002.
- WIECH, H., BUCHNER, J., ZIMMERMANN, R., JAKOB, U. Hsp90 chaperones protein folding in vitro. **Nature**, 358: 169–170, 1992.
- WIESGIGL, M., CLOS, J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. **Mol. Biol. Cell.**, 12: 3307–3316, 2001.
- WIRTZ, E., LEAL, S., OCHATT, C., CROSS, G. A. Regulated processive transcription of chromatin by T7 RNA polymerase in *Trypanosoma brucei*. **Nucleic Acids Res.** 99:89–101, 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas' disease. **WHO Tech. Rep. Ser. 905**. Geneva:WHO, 2002.
- YOUNG, J. C., OBERMANN, W. M. & HARTL, F. U. Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. **J. Biol. Chem.**, 273: 18007–18010, 1998.
- YOUNG, J.C., MOAREFI, I., HARTL, F.U. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. **J Cell Biol.**, 154(2):267-73, 2001.
- ZANATA, S.M., LOPES, M.H., MERCADANTE, A.F., HAJJ, G.N., CHIARINI, L.B., NOMIZO, R., FREITAS, A.R., CABRAL, A.L., LEE, K.S., JULIANO, M.A., DE OLIVEIRA, E., JACHIERI, S.G., BURLINGAME, A., HUANG, L., LINDEN, R., BRENTANI, R.R., MARTINS, V.R. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO J.**, 21:3307-16, 2002.
- ZELEDÓN, R., BOLAÑOS, R., ROJAS, M. Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. **Acta Trop.** 41:39-43, 1984.
- ZHANG, Z., QUICK, M. K., KANELAKIS, K. C., GIJZEN, M., KRISHNA, P. Characterization of a plant homolog of hop, a cochaperone of hsp90. **Plant Physiol.**, 131: 525-535, 2003.

ZILBERSTEIN, D., SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, 48:449-70, 1994.

ZINGALES, B.; PEREIRA, M. E.; OLIVEIRA, R. P.; ALMEIDA, K. A.; UMEZAWA, E. S.; SOUTO, R. P.; VARGAS, N.; CANO, M. I.; DA SILVEIRA, J. F.; NEHME, N. S.; MOREL, C. M.; BRENER, Z.; MACEDO, A. *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. **Acta Trop.** 68(2): 159-173, 1997.

APÊNDICE 1 – PERFIL DE EXPRESSÃO DO GENE *Tcsti-1* ANALISADO POR MICROARRANJO DE DNA EM DIFERENTES FORMAS DO PARASITA

Dados obtidos com parasitas na forma epimastigota (Epi), tripomastigota metacíclico (Meta), tripomastigota sanguíneo (Tripo) e amastigota (Ama). As intensidades de sinal para a sonda específica para o gene *Tcsti-1* foram obtidas a partir de 4 réplicas biológicas. Cada coluna representa os valores da média e as barras, o desvio padrão.



APÊNDICE 2 – PADRÃO DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TcSTI-1 NA ANÁLISE PROTEÔMICA EM DIFERENTES FORMAS DO PARASITA NA METACICLOGÊNESE

Dados obtidos com parasitas na forma epimastigota em fase exponencial de crescimento (Epi), em fase tardia de crescimento sob estresse nutricional de 30 minutos (St30m) e 2 horas (St2h), epimastigotas aderidos ao substrato por 12 horas (Ad12h) e formas tripomastigotas metacíclicas (Met). As cores vermelha e verde representam maior ou menor número de peptídeos em relação à média dos peptídeos de todas as amostras, respectivamente. A cor preta representa número de peptídeos igual em relação à média de todas as amostras.

